

**Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Evaluation der Eignung von MALDI-TOF MS zur
mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontologie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stefanie Lindner

aus Friedberg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatlerin: Prof. Dr. med. dent. Karin C. Huth, MME

Mitberichterstatler: PD Dr. Wolfgang Fischer
Prof. Dr. Johannes Randzio

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. dent. Maximilian Kollmuß

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2019

1	Einleitung	5
1.1	Definition und Epidemiologie der Parodontitis	6
1.2	Ätiologie der Parodontitis	6
1.2.1	Organisation der Bakterien als Biofilm	7
1.2.2	Spezielle Mikrobiologie der subgingivalen Plaque	8
1.2.3	Bakterienkomplexe nach Socransky	9
1.3.	Mikrobiologische Diagnostik in der Parodontologie	11
1.3.1	Indikationen und Zeitpunkt	12
1.3.2	Methoden der Anaerobierdiagnostik.....	13
1.3.2.1	Traditionelle Nachweisverfahren	13
1.3.2.2	Enzymatische Tests	14
1.3.2.3	Immuntests.....	15
1.3.2.4	Molekularbiologische Methoden	16
1.4	Verfahren der MALDI-TOF MS.....	17
1.4.1	Direktnachweis von Erregern aus Patientenproben	18
1.4.1.1	Positive Blutkulturen.....	19
1.4.1.2	Urinproben	19
1.4.2	Resistenzbestimmungen	20
1.4.3	Identifizierung oraler Mikroorganismen	20
1.5	Fragestellung und Zielsetzung	22
2	Material und Methode.....	23
2.1	Patientenkollektiv	24
2.2	Anamneseerhebung und Befundung	25
2.3	Probenentnahme.....	26
2.4	Erregeridentifikation mittels MALDI-TOF MS	27
2.4.1	Bakterienisolierung in der anaeroben Kammer	28
2.4.2	Kultivierung der Bakterien	30
2.4.3	Isolierung von Reinkulturen	31
2.4.4	Extraktion von ribosomalen Proteinen.....	32
2.4.5	Prinzip der MALDI-TOF MS-basierten Speziesbestimmung	33
2.4.5.1	Einbettung der Proben auf der MALDI-Targetplatte	36
2.4.5.2	Messung und Datenbankabgleich der Massenspektren.....	37
2.4.6	Stammerhaltung der Keime.....	38
2.5	Erregeridentifikation mittels PariDent	40
2.5.1	DNA-Isolation	41
2.5.2	PariDent PAF/PMT-PCR	44
2.5.3	PariDent ELISA	45
2.5.3.1	Durchführung der reversen Hybridisierung.....	46
2.5.3.2	Auswertung der gemessenen Extinktionen	48
2.6	Statistische Auswertung	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Deskriptive Ergebnisse der klinischen Untersuchung.....	50
3.1.1	Familiäre Vorbelastung	51
3.1.2	Medikamentenanamnese	51
3.1.3	Manifestation von systemischen Erkrankungen	53
3.1.4	Tabakkonsum.....	53
3.1.5	Vergangene parodontale Behandlungsmaßnahmen	54
3.1.6	Auftreten von Symptomen und Zahnverlusten	55

3.1.7	Aktueller parodontaler Zustand	57
3.1.7.1	Behandlungsbedürftige Stellen	57
3.1.7.2	Behandlungsbedürftige Zähne	58
3.2	Mikrobiologische Auswertung.....	60
3.2.1	MALDI-TOF MS-basierte Speziesbestimmung	60
3.2.1.1	Bestimmung der Keimzahlen	60
3.2.1.2	Unterteilung nach Gattungen	60
3.2.2	Keimbestimmung durch PariDent.....	65
3.2.3	Übereinstimmung beider Diagnostikmethoden.....	66
3.2.4	Korrelationen zwischen Zahnverlusten und identifizierter Spezies...	69
4	Diskussion	70
5	Zusammenfassung.....	81
6	Literaturverzeichnis.....	83
7	Abbildungsverzeichnis und Tabellen.....	93
8	Abkürzungsverzeichnis	95
9	Danksagung	96
Anhang 1	- Patienteninformation und Einwilligungserklärung	97
Anhang 2	- Anamnesebogen	101
Anhang 3	- Befundbogen	103
Anhang 4	- Votum der Ethikkommission	105
Anhang 5	- Rezepte und Versuchsansätze	107
Anhang 6	- Tabellen und Übersichten.....	110

1 **Einleitung**

Parodontitis zählt neben Zahnkaries zu den bedeutendsten Erkrankungsbildern des stomatognathen Systems. In Deutschland hat die Prävalenz der Parodontitiden mittlerweile ein beachtliches quantitatives Ausmaß erreicht und insbesondere die Fallzahlen schwerer Verlaufsformen haben zugenommen (Jordan und Micheelis 2016; Micheelis 2011). Die sichere Kontrolle der durch Bakterien hervorgerufenen Infektion des Parodonts ist essentiell, um die Progredienz der Erkrankung zu verhindern. Dies gelingt oft durch mechanische Reinigungsmaßnahmen. In manchen Fällen, vor allem bei schweren und therapierefraktären Krankheitsverläufen, ist zusätzlich die systemische Gabe von Antibiotika erforderlich (Mombelli *et al.* 2015). Die adjuvante Antibiotikatherapie muss dabei auf die vorliegende Infektion ausgerichtet sein, was wiederum eine präzise Kenntnis über die in der Zahnfleischtasche vorhandene parodontalpathogene Flora voraussetzt (Beikler *et al.* 2004). Zur Identifikation parodontitisassoziierter Mikroorganismen werden derzeit routinemäßig mikrobiologische Tests angewandt, welche auf PCR-basierten Methoden beruhen. Große Nachteile dieser Verfahren sind allerdings, dass sie arbeitsintensiv sind und durch die Auswahl spezifischer Primer nur solche Bakterien nachgewiesen werden können, die auch in der Probe vermutet werden. Darüber hinaus sind die Kosten für diese Tests relativ hoch und müssen vom Patienten selbst getragen werden, da sie kein Bestandteil des Leistungskataloges der gesetzlichen Krankenversicherung sind.

Der innovative Ansatz der Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) ist in der mikrobiologischen Diagnostik bereits Routine und beruht auf der Analyse des Proteinprofils von vornehmlich ribosomalen Proteinen einer Bakterien- oder Pilzkultur (Schubert und Wieser 2010). Durch Laserbeschuss der Proteine entstehen charakteristische Massenspektren, die mit einer Datenbank verglichen werden. Die rasche Erregeridentifizierung erfolgt anschließend durch eine computergestützte Auswertung (Wieser *et al.* 2012). Nun stellt sich die Frage, inwieweit sich das MALDI-TOF MS-Verfahren zur Diagnostik von parodontitisassozierten Mikroorganismen eignet. Als Kontrollgruppe kommt ein standardmäßig angewandtes PCR-basiertes Testkit (PariDent) zum Einsatz.

1.1 Definition und Epidemiologie der Parodontitis

Als Parodontitis bezeichnet man die entzündlich bedingte Erkrankung der Gingiva und des Zahnhalteapparates, die mit Alveolarknochenabbau einhergeht (Hellwig *et al.* 2013). Sie stellt mit Abstand die häufigste Form der parodontalen Destruktion dar (Jordan und Micheelis 2016; Micheelis 2011; Papapanou *et al.* 2018).

Trotz erheblicher Verbesserungen der Mundgesundheit in Bezug auf Karies seit 1997 wurde bis 2005 in Deutschland ein deutlicher Anstieg der Parodontitisprävalenz augenfällig (Micheelis und Schiffner 2006). 1997 konnten bei 46,3% der Erwachsenen zwischen 35 und 44 Jahren milde bis schwere Verlaufsformen der Parodontitis verzeichnet werden. Im Jahre 2005 stieg die Prävalenz in dieser Altersgruppe um 26,9% an. Ähnliche Tendenzen sind auch bei Jugendlichen und Senioren auffällig (Schiffner *et al.* 2009). Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass die Einzelzahnverluste bei den 35- bis 44-Jährigen zwischen 1997 und 2005 deutlich zurückgegangen sind (Schutzhold *et al.* 2013). Es besteht kein Zweifel daran, dass ein Zusammenhang zwischen den angestiegenen Fallzahlen der Parodontitis und der höheren Überlebensrate natürlicher Zähne besteht. Die Entwicklungen verdeutlichen daher die Notwendigkeit der Früherkennung, der zielgerichteten Behandlung, sowie der risikoorientierten Nachsorge von Parodontopathien mehr Beachtung einzuräumen.

1.2 Ätiologie der Parodontitis

Der entscheidende Initiator entzündlicher Parodontalerkrankungen ist das Vorhandensein von Mikroorganismen im dentalen Biofilm. Dennoch erkranken nicht alle Träger parodontalpathogener Keime zwangsläufig an einer Parodontitis (Hellwig *et al.* 2013).

Die Manifestation und die Progredienz von Parodontitiden werden neben der Virulenz parodontitisassoziierter Bakterien in der parodontalen Tasche auch von prädisponierenden endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst. Auf die bakterielle Infektion reagiert der Wirtsorganismus unter Vermittlung verschiedener Mediatoren mit einer entzündlichen Abwehrreaktion. Diese trägt zusätzlich zur parodontalen Destruktion bei und kann unverhältnismäßig (defekt oder überschießend) verlaufen (Graves *et al.* 2000; Rateitschak und Wolf 2004). Zu

berücksichtigen sind außerdem verhaltensbedingte und allgemeinmedizinische Einflussfaktoren wie beispielsweise Tabakkonsum, Diabetes mellitus und genetische Aspekte (Albandar *et al.* 2000; Nunn 2003; Taylor 2001). Sie führen dazu, dass die Anfälligkeit an einer Parodontitis zu erkranken individuell unterschiedlich ist. Die komplexen Zusammenhänge unterstreichen somit den multifaktoriellen Charakter der Erkrankung.

1.2.1 Organisation der Bakterien als Biofilm

Einzelne parodontopathogene Mikroorganismen sind nicht für sich allein wirksam. Sie agieren als Bestandteile komplexer mikrobieller Gemeinschaften, die als Biofilm bezeichnet werden (Armitage 2010). Biofilme haften sich an feste Oberflächen an und bestehen aus Mikrokolonien bakterieller Zellen, die in einer selbst geformten Matrix oder Glykokalix eingebettet sind (Socransky und Haffajee 2002). Das Wachstum innerhalb dieser funktionellen Gemeinschaften ist für Bakterien in vielerlei Hinsicht von Vorteil. Hervorzuheben ist vor allem die Schutzfunktion des Biofilms. Mikroorganismen können sich Abwehrreaktionen des Wirtsorganismus entziehen und sind vor Angriffen potentiell toxischer Substanzen geschützt (Socransky und Haffajee 2002). Dies bedeutet, dass Biofilme im Vergleich zu frei schwimmenden planktonischen Bakterien eine 100- bis 1000-fach höhere Toleranz gegenüber Antibiotika aufweisen. Das trägt wiederum zur Steigerung der Pathogenität der vorhandenen Bakterien bei (Ceri *et al.* 1999). Derzeit werden verschiedenste Mechanismen diskutiert, die zum Anstieg des Toleranzlevels in Biofilmen führen sollen. Neben der klassischen Resistenz spielen auch noch die Matrix als physikalische Barriere, veränderte Stoffwechselaktivitäten, Mutationen in Bakterienzellen und Gentransfers eine Rolle (Olsen 2015). Die in Biofilmen vorliegenden Bakterien zeichnen sich ferner durch komplexe wechselseitige Stoffwechselbeziehungen aus. Ein weiteres Phänomen ist das „Quorum sensing“, das eine zelldichteabhängige Signaltransduktion beschreibt und zu einer Funktionsänderung der Mikroorganismen führen kann (Gängler *et al.* 2010).

Neben den oralen Infektionskrankheiten Parodontitis und Karies kommt der Biofilmbildung bei den sogenannten „Plastikinfektionen“, der Infektion von Kathetern und Implantaten, eine wesentliche Bedeutung zu. Durch die Hände des Arztes oder durch die patienteneigene Flora kann der schleimproduzierende

Erreger *Staphylococcus epidermidis* von der Haut auf die Implantatoberfläche gelangen (Hof und Dörries 2014). Erhebliche Komplikationen wie etwa eine Sepsis können die Folge sein (Burchard *et al.* 1984).

Die Zahnplaque stellt einen weiteren Repräsentanten eines bakteriellen Biofilms im menschlichen Organismus dar (Marsh und Bradshaw 1995). Die subgingivale Plaque apikal des Gingivalsaums ist dabei durch spezifische Faktoren gekennzeichnet. Durch das sauerstoffarme Milieu im Sulcus gingivae der parodontalen Tasche erfolgt eine Besiedelung von überwiegend anaeroben Bakterien (Abiko *et al.* 2010; Slots und Ting 1999). Uematsu und Hoshino untersuchten die bakterielle Zusammensetzung der subgingivalen Plaque von Patienten mit fortgeschrittenen parodontalen Läsionen. So erwiesen sich 90% der isolierten Reinkulturen als obligat anaerob (Uematsu und Hoshino 1992). Die grampositiven Pionierkeime der Gattung *Actinomyces spp.* stellen einen wesentlichen Bestandteil des Grundgerüsts der supra- und subgingivalen Plaque dar. Allerdings kommt es bei fortschreitender Progression einer Parodontitis, insbesondere im subgingivalen Lebensraum zu einem signifikanten Abfall des Gehaltes an Aktinomyzeten. Dabei rückt die Besiedelung durch gramnegative Gattungen in den Vordergrund (Socransky und Haffajee 2002). Zusammenfassend ist die subgingivale Plaque umso parodontopathogener einzustufen, je mehr anaerobe und gramnegative Mikroorganismen in ihr vorliegen (Plagmann 1998). Ferner stellt die supragingivale Plaque für das subgingivale Milieu eine Art Reservoir hinsichtlich mutmaßlicher Parodontopathogene dar. Von der supragingivalen Umgebung ausgehend, kann somit eine Infektion gesunder Stellen oder die Wiederbesiedelung von bereits parodontal behandelten Zähnen eintreten (Ximenez-Fyvie *et al.* 2000).

1.2.2 Spezielle Mikrobiologie der subgingivalen Plaque

Von den in der Mundhöhle bisher geschätzten über 1000 Bakterienspezies stehen nur relativ wenige mit der Ätiologie entzündlicher Parodontalerkrankungen in Verbindung (Gängler *et al.* 2010). Der World Workshop in Periodontics stufte 1996 lediglich *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Tannerella forsythia* als starke parodontopathogene Erreger ein (Consensus report. Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors 1996). In einer später durchgeführten Studie zeigten darüber hinaus *Prevotella intermedia*,

Prevotella nigrescens, *Treponema denticola* und *Fusobacterium nucleatum* eine hohe Prävalenz in der subgingivalen Plaque parodontal geschädigter Zähne (Ximenez-Fyvie *et al.* 2000). Schließlich ergänzte 2005 die Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde die Liste der am meisten mit Parodontitiden assoziierten Pathogene um *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Streptococcus intermedius* und *Parvimonas micra* (Beikler *et al.* 2005). So stellte sich bei einem Vergleich der subgingivalen Flora von Stellen mit und ohne parodontalen Läsionen heraus, dass *T. forsythia* und *P. gingivalis* fast ausschließlich bei parodontaler Destruktion nachweislich sind (Abiko *et al.* 2010). Eine ähnliche Studie hebt hervor, dass *P. intermedia*, *T. denticola* und insbesondere *P. gingivalis* deutlich häufiger in der subgingivalen Plaque von Patienten mit Parodontitis auftreten (Mayanagi *et al.* 2004). Van Winkelhoff und Mitarbeiter konnten bei der Untersuchung von 116 Erwachsenen mit moderater bis schwerer Parodontitis und einer gesunden Kontrollgruppe feststellen, dass *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *F. nucleatum* und *P. micra* bei vorliegender parodontaler Schädigung einen höheren Anteil an der subgingivalen Gesamtflora einnehmen (van Winkelhoff *et al.* 2002).

Slots und Ting berichten, dass das Vorkommen von *A. actinomycetemcomitans* im subgingivalen Biofilm häufig in Korrelation mit lokalisierten aggressiven Verlaufsformen steht. Darüber hinaus übernimmt *P. gingivalis* eine zentrale Stellung bei der Manifestation von Parodontitiden (Slots und Ting 1999). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass es grundsätzlich nicht möglich ist anhand der Präsenz bzw. der Abwesenheit von bestimmten parodontitisassoziierten Mikroorganismen zu unterscheiden, welche parodontale Erkrankungsform vorliegt (Mombelli *et al.* 2002). Das Auftreten von Parodontopathogenen im subgingivalen Milieu von Patienten mit Parodontitis unterliegt starken individuellen Variationen (Paster *et al.* 2001).

1.2.3 Bakterienkomplexe nach Socransky

Es ist seit längerem bekannt, dass bei der Auslösung der Entzündung nicht nur Einzelkeimen sowie deren Subspezies Beachtung geschenkt werden muss. Achtenswert erscheint zudem deren gemeinsames Auftreten in Komplexen im subgingivalen Biofilm und deren Relation zu einer mit Gesundheit assoziierten Standortflora (Gängler *et al.* 2010). Socransky und Haffajee haben mehr als 13000

subgingivale Plaqueproben sogenannte „Cluster-Analysen“ unterzogen, um die vorliegenden bakteriellen Gemeinschaften zu definieren und die Zusammenhänge der Komplexe mit klinischen Parametern zu klären. Folgende 6 eng verbundene Bakteriengruppen konnten beobachtet werden: Die Gruppe mit der Gattung *Actinomyces spp.*, der rote Komplex mit *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola*, und der orange Komplex unter anderem mit *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* und *P. micra*. Der grüne Komplex wird unter anderem von *A. actinomycetemcomitans* Serotyp a, *E. corrodens* sowie *Campylobacter concisus* gebildet. Hinzu kommt der gelbe Komplex mit Bakterien der Gattung *Streptococcus spp.* sowie der violette Komplex, bestehend aus *Veillonella parvula* und *Actinomyces odontolyticus*. Lediglich *A. actinomycetemcomitans* Serotyp b, *Selenomonas noxia* und *Actinomyces viscosus* lassen sich keiner Gruppe zuordnen. Insbesondere der rote Komplex zeigt dabei einen deutlichen Zusammenhang mit den klinischen Parametern Blutung auf Sondierung (BOP) und Taschensondierungstiefe. Beachtlich ist, dass Stellen mit den tiefsten parodontalen Taschen durch die alleinige Präsenz von *P. gingivalis* oder durch die Anwesenheit aller drei Bakterienspezies gekennzeichnet waren (Socransky *et al.* 1998). Die hohe Pathogenität von *P. gingivalis* und des roten Komplexes als Ganzes wird dadurch augenscheinlich.

Des Weiteren ist auffällig, dass bestimmte Kombinationen verschiedener Komplexe bevorzugt in der subgingivalen Plaque anzutreffen sind. So liegen beispielsweise der rote und der orange Komplex häufig zusammen mit allen anderen bakteriellen Gemeinschaften vor. Selten hingegen lassen sich der rote und der orange Komplex alleine auffinden (Socransky und Haffajee 2002).

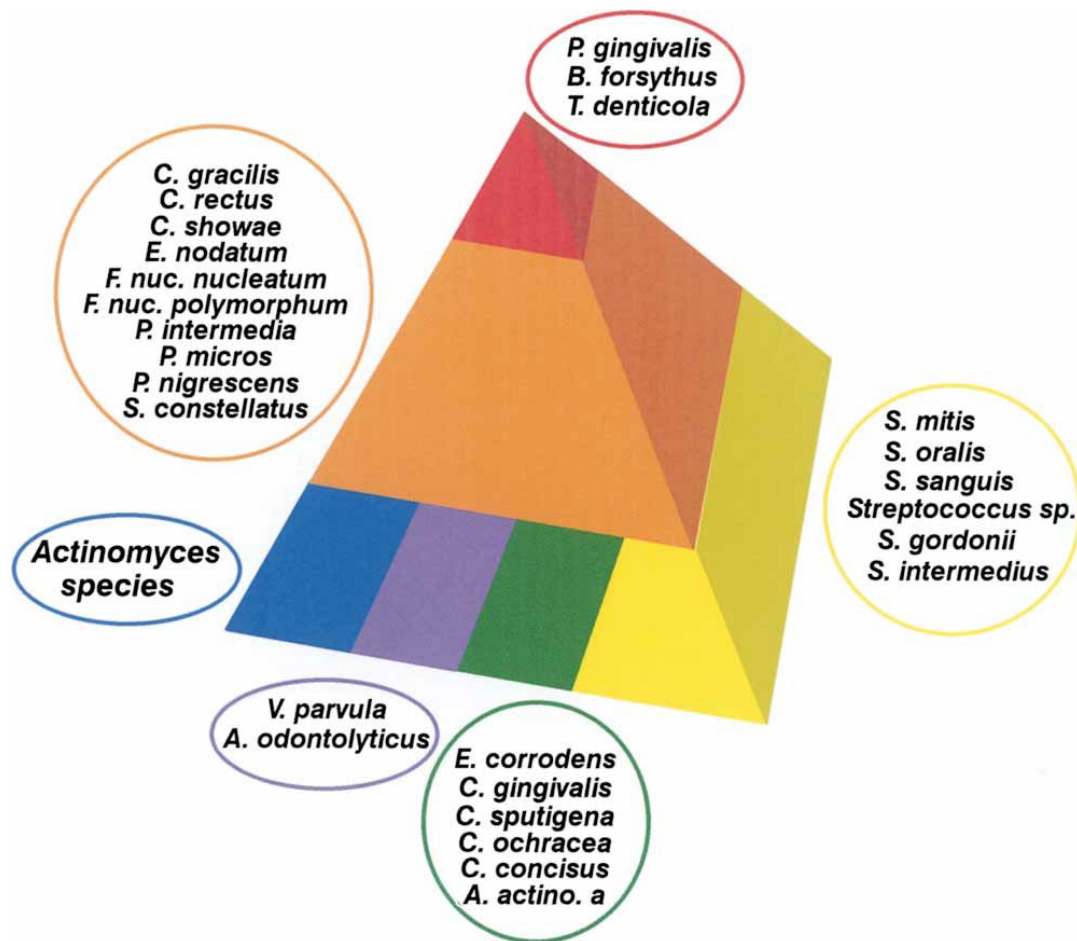


Abbildung 1: Assoziation zwischen subgingivalen Bakterienspezies (Socransky und Haffajee, 2002)

Die zeitliche Abfolge der Kolonisation der Zahnoberfläche wird durch die Abbildung 1 veranschaulicht. Die Basis der Pyramide wird von Spezies gebildet, die als mutmaßliche Frühbesiedler angesehen werden. Der orange Komplex gewinnt im weiteren Verlauf zunehmend an Bedeutung und vereint vermutlich die Spezies des roten Komplexes mit den elementaren Bakterienkomplexen der Plaqueentwicklung (Socransky und Haffajee 2002).

Es wird einmal mehr verdeutlicht, dass die dentale Plaque als stabile, hochkomplexe Organisationsform agiert, was wiederum bei der Auswahl geeigneter Therapiekonzepte berücksichtigt werden muss (Beikler *et al.* 2004).

1.3 Mikrobiologische Diagnostik in der Parodontologie

Zur Identifikation der in der parodontalen Tasche vorhandenen, am meisten mit Parodontitiden assoziierten Pathogene werden möglichst repräsentative Proben der subgingivalen Plaqueflora von erkrankten Parodontien benötigt. Diese werden

entweder mit einer Kürette oder mit sterilen Papierspitzen, die bis zum Taschenfundus vorgeschoben werden, entnommen. Die Plaqueproben werden anschließend in ein geeignetes Transportmedium überführt und in ein klinisches Labor zur weiteren Diagnostik geschickt. Auch eine unmittelbare Analyse der Patientenprobe in der Zahnarztpraxis ist möglich (Loomer 2004). Dies gelingt durch enzymatische Bakterientests oder durch Betrachtung der parodontalpathogenen Taschenflora im Lichtmikroskop. Allgemein steht zum Nachweis der parodontitisassoziierten Mikroorganismen eine Vielzahl verschiedener mikrobiologischer Verfahren zur Verfügung.

1.3.1 Indikationen und Zeitpunkt

Eine mikrobiologische Analyse der subgingivalen Plaque in der klinischen Praxis ist nur dann sinnvoll, wenn sich aus ihr eine therapeutische Konsequenz ergibt. Im Wesentlichen ist die mikrobiologische Diagnostik nur bei Parodontitiden indiziert, bei denen die Indikation zur systemischen adjuvanten Antibiotikatherapie gegeben ist (Beikler *et al.* 2005). Die Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde beschränkt die Indikation zur unterstützenden Antibiotikatherapie auf die aggressive Parodontitis, schwere chronische Parodontitis, therapierefraktäre und nekrotisierende Verlaufsformen, Parodontalabszesse und auf mittelschwere bis schwere Parodontitiden bei vorliegenden systemischen Erkrankungen oder Zuständen, die die Funktion des Immunsystems beeinträchtigen (Beikler *et al.* 2003). Eine Anpassung an die neue Klassifikation von Parodontalerkrankungen sollte in Zukunft erfolgen (Tonetti *et al.* 2018). Entscheidend bei der mikrobiologischen Diagnostik ist der qualitative Nachweis der in der subgingivalen Flora enthaltenen Parodontopathogene. Eine quantitative Bestimmung kann jedoch gemeinsam mit klinischen Parametern den Erfolg einer Parodontitistherapie detaillierter beschreiben.

Damit das Ergebnis der mikrobiologischen Diagnostik idealerweise nach Abschluss des supra- und subgingivalen Debridements (Initialtherapie) vorliegt, sollte sie vor Beginn jeglicher Therapiemaßnahmen erfolgen. Direkt nach den mechanischen Reinigungsmaßnahmen kann somit ein auf die vorliegende Infektion ausgerichtetes Antibiotikum ausgewählt werden (Mombelli *et al.* 2015; Slots *et al.* 2004).

1.3.2 Methoden der Anaerobierdiagnostik

Die korrekte Interpretation der mikrobiologischen Diagnostik setzt genaue Kenntnisse über die Aussagekraft der verwendeten Methoden voraus. Zum Nachweis der vornehmlich obligat anaeroben parodontitisassoziierten Bakterien stehen neben den traditionellen Methoden Mikroskopie und Kultivierung, auch Immuntests, enzymatische Tests und molekularbiologische Verfahren zur Verfügung. Der Einsatz der unterschiedlichen diagnostischen Möglichkeiten hat sich sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Praxis im Laufe der Zeit geändert.

1.3.2.1 Traditionelle Nachweisverfahren

Die erste wissenschaftliche Untersuchung der Zahnplaque im Jahre 1683 geht auf Antoni van Leeuwenhoek zurück. Durch mikroskopische Betrachtung wird erstmals die bakterielle Zusammensetzung und Komplexität der Plaque beschrieben (Tal 1980). Bakterien sind im Lichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung gerade noch sichtbar (Hof und Dörries 2014). So lässt sich mittels Dunkelfeld- und Phasenkontrastmikroskopie auch in der zahnärztlichen Praxis die Flora der parodontalen Tasche einfach analysieren. Beobachtet man unter dem Mikroskop viele bewegliche Bakterien (z.B. Stäbchen und Spirochäten), deutet dies auf eine Aktivitätsphase der Taschenflora hin. Liegen hingegen vorwiegend nicht bewegliche Bakterien und Kokken vor, ist eher mit einer wenig aktiven parodontalen Tasche zu rechnen (Rateitschak und Wolf 2004). Allerdings sind nicht bewegliche, wichtige parodontitisassoziierte Erreger wie *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* nicht durch mikroskopische Untersuchungen identifizierbar, was leicht zu falschen Interpretationen führen kann (Greenstein 1988). Da die Dunkelfeld- und Phasenkontrastmikroskopie Bakterien nur anhand morphologischer Kriterien bestimmen können und keine Differenzierung der Mikroorganismen auf Speziesebene erlauben, sind sie für die mikrobiologische Diagnostik der Parodontitis als obsolet anzusehen.

Aufgrund der Einschränkungen der mikroskopischen Untersuchung etablierten sich in der mikrobiologischen Diagnostik von Parodontopathogenen zunächst Kulturmethoden (Moore 1987; Ranney *et al.* 1987). So führte Slots bereits 1975 eine qualitative und quantitative Analyse der subgingivalen mikrobiellen Flora bei

aggressiver Parodontitis mit einer anaeroben Bakterienkultur durch (Slots 1977). Im Allgemeinen werden subgingivale Plaqueproben dabei unter anaeroben Bedingungen auf selektiven oder nicht selektiven Nährböden kultiviert. Die anschließende Identifikation der parodontitisassoziierten Mikroorganismen erfolgt durch verschiedene biochemische und physikalische Tests (Sanz *et al.* 2004). In diesem Zusammenhang muss angefügt werden, dass nicht alle Parodontopathogene mit Standardverfahren kultivierbar sind. So lassen sich Spirochäten und *T. forsythia* nur sehr schwer mit Kulturmethode nachweisen (Loesche *et al.* 1992). Ferner werden für die Untersuchung mittels Kultivierung vitale Bakterien benötigt (D'Ercole *et al.* 2008). Auf dem Transportweg zum Labor abgestorbene Keime entgehen somit der Analyse. Ein wesentlicher Vorteil besteht jedoch in der Möglichkeit Resistenzbestimmungen von den in der subgingivalen Plaqueprobe enthaltenen Mikroorganismen durchzuführen (Slots 1986).

Insgesamt muss hervorgehoben werden, dass der für eine vollständige Untersuchung mithilfe von Kulturmethode erforderliche Personal-, Kosten- und Zeitaufwand sehr hoch ist.

1.3.2.2 Enzymatische Tests

Die Beurteilung von qualitativen und quantitativen Veränderungen von spezifischen Enzymen im Speichel kann zum Nachweis parodontopathogener Bakterien herangezogen werden (Greenstein 1988). Eine Studie von Nakamura und Slots zeigte, dass der Enzymgehalt des Speichels bei Personen mit unbehandelter Parodontitis höher ist als bei einer gesunden Kontrollgruppe (Nakamura und Slots 1983). Ferner konnte festgestellt werden, dass die Wirksamkeit einer Parodontalbehandlung anhand von Veränderungen spezifischer Enzymaktivitäten kontrolliert werden kann. So erfolgte nach vorangegangener Antibiotikatherapie, kombiniert mit mechanischen Therapiemaßnahmen, eine signifikante Abnahme bestimmter Speichelenzyme (Zambon *et al.* 1985a). Diese Untersuchungen führen jedoch zu keiner exakten Identifikation von parodontopathogenen Mikroorganismen.

Loesche fand heraus, dass *P. gingivalis*, *T. denticola* und *T. forsythia* in ihrem Stoffwechsel ein trypsinähnliches Enzym bilden. Diese bakterielle Peptidase kann synthetische Substrate spalten, bei denen Arginin an einer chromophoren Gruppe

angehängt ist. Bei der Hydrolyse des Substrates BANA (N- α -benzoyl-DL-arginin-2-naphthylamid) durch die Peptidase wird eine Farbreaktion sichtbar, die sich zum Keimnachweis verwenden lässt (Loesche 1992). Der BANA-Test zum Nachweis der drei erwähnten Parodontopathogene wurde in den 90er-Jahren auf dem Markt eingeführt und stellt einen einfachen Test dar, der rasch am zahnärztlichen Behandlungsstuhl durchgeführt werden kann (Sanz *et al.* 2004). Der Test erlaubt jedoch keine Unterscheidung, welche der drei BANA-positiven parodontitisassoziierten Mikroorganismen vorliegen (Loesche 1992). Zudem kann der robuste *A. actinomycetemcomitans* nicht identifiziert werden. Als weiterer Nachteil ist anzuführen, dass andere wenig pathogene Bakterien der parodontalen Tasche ebenfalls BANA hydrolysieren können und somit zu einem falsch positiven Testergebnis führen (Rateitschak und Wolf 2004). Aufgrund der niedrigen Sensitivität und Spezifität und der damit verbundenen eingeschränkten Aussagekraft sind die enzymatischen Nachweismethoden in der Parodontitistherapie schnell in den Hintergrund gerückt.

1.3.2.3 Immuntests

Bei Immunoassays erfolgt die Identifikation von Bakterien im Allgemeinen durch monoklonale oder polyklonale Antikörper, die gegen spezifische bakterielle Antigene gerichtet sind (Loomer 2004). Die daraus resultierende Antigen-Antikörper-Reaktion kann durch verschiedenste Methoden, einschließlich der Latexagglutination, der Durchflusszytometrie, des ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay) und der direkten und indirekten Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Dabei fand der indirekte Immunfluoreszenztest in wissenschaftlichen Untersuchungen weitestgehend beim Nachweis von *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* Anwendung (Sanz *et al.* 2004). Bakterielle Antigene werden hierbei mithilfe eines Primärantikörpers und eines fluorogenmarkierten weiteren Antikörpers, mit Spezifität für den Primärantikörper, unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert (Hof und Dörries 2014). Beim Vergleich mit der traditionellen Kultivierung konnte 1985 gezeigt werden, dass sich der indirekte Immunfluoreszenztest durchaus zum Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* in subgingivalen Plaqueproben eignet (Bonta *et al.* 1985; Zambon *et al.* 1985b). Der ELISA beruht auf einer durch enzymmarkierte Zweitantikörper hervorgerufenen Farbreaktion, die mit einem

Photometer verfolgt werden kann (Greenstein 1988). So konnten Clerehugh und Mitarbeiter durch die Auswahl spezifischer monoklonaler Antikörper, die mit dem Enzym Meerrettichperoxidase markiert waren, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und *P. intermedia* in der subgingivalen Plaque bei einer jugendlichen Studienpopulation nachweisen (Clerehugh *et al.* 1997). In der konventionellen Diagnostik von parodontitisassoziierten Bakterien haben sich Immunoassays jedoch kaum durchgesetzt. Aufgrund der Auswahl spezifischer Antikörper lassen sich mit diesen Verfahren schließlich nur die Bakterien identifizieren, die auch in der Probe vermutet werden. Ferner wurden im Vergleich zu anderen Diagnostikmethoden in der Parodontitistherapie relativ wenige wissenschaftliche Studien bezüglich der Validität von Immuntests durchgeführt.

1.3.2.4 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden basieren prinzipiell auf der Detektion des Genoms eines Mikroorganismus, seiner Bruchstücke oder auf dem Nachweis von RNA-Transkripten (Hof und Dörries 2014). Nach ihrer Etablierung Mitte der 80er-Jahre haben sich diese Verfahren zum Nachweis von Parodontitiserregern im Labor immer mehr durchgesetzt (Sanz *et al.* 2004). Dies lässt sich wahrscheinlich unter anderem auf ihre relativ hohe Empfindlichkeit und deren Unabhängigkeit von der Lebensfähigkeit der Bakterien zurückführen.

Bei der DNA-Hybridisierung erfolgt die Erregeridentifikation durch die Bindung von spezifischen radioaktiv- oder enzymmarkierten DNA-Sonden an komplementäre Nukleinsäuresequenzen der nachzuweisenden Parodontopathogene (Loomer 2004). Socransky *et al.* entwickelten die Checkerboard DNA-DNA Hybridisierungstechnik, die einen schnellen Nachweis von bis zu 40 oralen Bakterienspezies in einer Vielzahl von Patientenproben erlaubt und sich somit vor allem für epidemiologische Studien gut eignet (Socransky *et al.* 2004). Parodontopathogene, die nicht in der Patientenprobe erwartet werden entgehen allerdings der Untersuchung, da mit dieser Methode nur Bakterienspezies identifizierbar sind, für die zuvor spezifische Sonden vorbereitet wurden.

Bis heute werden routinemäßig mikrobiologische Keimtests zum Nachweis von parodontitisassoziierten Mikroorganismen eingesetzt, welche auf Polymerasekettenreaktion (PCR)-basierten Suchtests beruhen. Vereinfacht

formuliert wird nach der subgingivalen Probenentnahme die bakterielle DNA in einem primären Extraktionsschritt isoliert. Die 16S rRNA Gensequenzen werden anschließend mithilfe von Primern und einer DNA-Polymerase amplifiziert. Die Amplifikationsprodukte können dann beispielsweise in einem Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung für die Identifikation sichtbar gemacht werden (Mayanagi *et al.* 2004). Beim Vergleich mit der traditionellen Kultivierung konnten D'Ercole und Mitarbeiter zeigen, dass sich einzelne Parodontopathogene mit der Methode der Multiplex-PCR sogar häufiger nachweisen lassen (D'Ercole *et al.* 2008). Durch Verfeinerung der PCR-basierenden Verfahren hat sich mittlerweile die Möglichkeit ergeben, die Erregerbeladung der subgingivalen Plaque zu bestimmen. So erlaubte die Real-Time-PCR sowohl eine erfolgreiche Identifikation als auch Quantifizierung von *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und insbesondere *T. forsythia*, dessen Nachweis durch kulturelle Anzucht generell sehr schwierig ist (Lau *et al.* 2004). Oft können quantitative Ergebnisse jedoch täuschen, da keine Unterscheidung zwischen lebenden und bereits abgestorbenen Bakterien erfolgt (Stingu *et al.* 2008). Auch hier liegt es in der Natur dieser Verfahren, dass durch die Auswahl spezifischer Primer nur solche Mikroorganismen nachgewiesen werden können, auf welche die Analyse gerichtet ist. Nicht von Vorteil sind ferner die relativ hohen Kosten der PCR-basierenden Methoden, die gegenwärtig vom Patienten selbst getragen werden müssen.

1.4 Verfahren der MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) repräsentiert in der mikrobiologischen Diagnostik einen vollkommen neuartigen Ansatz zur Differenzierung von Mikroorganismen und hat seit der Entwicklung in den 80er-Jahren durch Verfeinerung der Methodik mittlerweile Routinetauglichkeit erlangt (Wieser *et al.* 2012). Kennzeichnend für dieses massenspektrometrische Verfahren sind wesentliche Vorteile wie sehr kurze Analysenzeiten, einfache Bedienung und Automatisierbarkeit bei geringen Verbrauchskosten (Claydon *et al.* 1996). Darüber hinaus können alle anzüchtbaren Mikroorganismen untersucht werden und nicht nur jene, die in einer Probe vermutet werden.

Die MALDI-TOF MS-Diagnostik beruht auf der Analyse des Proteinprofils von mehrheitlich ribosomalen Proteinen einer Bakterien- oder Pilzkultur (Schubert und

Wieser 2010). Dabei wird zunächst eine Reinkultur des zu analysierenden Mikroorganismus angezüchtet und eine geringe Menge der Bakterienkultur auf die MALDI-Probenplatte (Target) aufgebracht. Um die Probe einzubetten, wird darauf eine Matrix-Lösung (Zimtsäure- oder Benzoessäurederivate) pipettiert, die mit dem Erreger auf der Targetplatte kokristallisiert. Die beladene Targetplatte kann nun in die Messkammer des Massenspektrometers eingeführt werden, in der eine Ionisierung der Erregerproteine durch Beschuss mit einem fokussierten Laserstrahl erfolgt. Die Analytmoleküle (Proteine) werden sodann im elektrischen Feld beschleunigt und trennen sich im Flugrohr entsprechend ihrer Ladung und Masse auf. Im Hochvakuum wird die Flugzeit der Analyten bis zum Auftreffen auf den Detektor gemessen und es ergeben sich schließlich speziesspezifische Massenspektren (Wieser *et al.* 2012). Die Identifikation eines Mikroorganismus auf Speziesebene erfolgt im Anschluss durch den vollautomatischen Abgleich der ermittelten Spektren mit Referenzdatenbanken, die eine große Zahl von Massenspektren bekannter eingelesener Isolate beinhalten (Cheng *et al.* 2016). Die automatisierte Auswertung der Daten erzeugt einen Zahlenwert (score), der die Validität des Differenzierungsergebnisses beschreibt. Werte größer 2 repräsentieren eine sehr sichere Identifikation, wobei auch weitere Ergebnisse zur Unterstützung der Plausibilitätskontrolle dargestellt werden können (Veloo *et al.* 2011). Außerordentlich interessant erscheint, dass die MALDI-TOF MS hinsichtlich der Identifikation von klinisch relevanten Anaerobiern einen Vorteil versprechenden Ansatz darstellt. Barreau und Mitarbeiter evaluierten die Eignung von MALDI-TOF MS zur Bestimmung der Spezies von über 1300 isolierten Anaerobiern und erreichten bei 92,5% der Isolate eine Score-Zahl $\geq 1,9$ (Barreau *et al.* 2013).

1.4.1 Direktnachweis von Erregern aus Patientenproben

Entwicklungsarbeiten sind unter anderem auf den Direktnachweis von Erregern aus Patientenproben ausgerichtet, wobei positive Blutkulturen und Urinproben gegenwärtig im Mittelpunkt des Interesses stehen.

1.4.1.1 Positive Blutkulturen

Eine schnellstmögliche Identifikation von Erregern einer Sepsis ist essentiell, um eine adäquate Antibiotikatherapie rechtzeitig einleiten zu können und die Mortalitätsraten aufgrund dieser Infektion zu senken (Kumar *et al.* 2006). Dabei ist das Problem bei der Direktidentifikation von Keimen aus positiven Blutkulturen mittels MALDI-TOF MS, dass große Mengen von Patientenproteinen in den Blutzellen den spezifischen Nachweis der Bakterien- oder Pilzproteine verschleiern. Um die Bakterien von den Wirtsproteinen zu trennen, konzentrierte man sich in der Folge auf die Entwicklung verschiedener Vorbereitungsprotokolle (Wieser *et al.* 2012). So stellten beispielsweise Schubert und Mitarbeiter ein rasch durchführbares Zellyse-Verfahren vor und konnten damit bei 86,5% der positiven Blutkulturen korrekte Identifikationen erreichen (Schubert *et al.* 2011). In aktuellen Forschungsarbeiten erfolgt hingegen der Erregernachweis mittels MALDI-TOF MS durch eine vorherige Anzucht und kurzzeitige Inkubation der Bakterien (Altun *et al.* 2015; Zabbe *et al.* 2015).

1.4.1.2 Urinproben

Aufgrund der fehlenden Normalflora und des geringen Proteingehalts stellt sich ein Direktnachweis von Erregern aus Urinproben wesentlich einfacher dar. Erfolg versprechend ist zudem, dass meistens ein einziger, prädominanter Keim einen Harnwegsinfekt hervorruft und so kaum Probleme mit gemischten Spektren bei der MALDI-TOF MS-Diagnostik entstehen können (Hof und Dörries 2014). Somit konnten in einer umfangreichen Studie direkt aus Urinproben mithilfe eines simplen Zentrifugationsprotokolls gefolgt von einem Extraktionsschritt, korrekte Identifikationsraten von 91,8% bis auf Speziesebene erreicht werden (bei einer Keimlast $>10^5$ KBE/ml) (Ferreira *et al.* 2010). Rosselló und Mitarbeiter berichten über ein ähnliches Ergebnis mit erfolgreichen Direktbestimmungen von 90% bei Bakterienzahlen $\geq 10^5$ KBE/ml. Umso höher die Konzentration der Bakterien in den Urinproben ist, desto bessere Ergebnisse können generell bei der direkten Identifizierung der Erreger erzielt werden (March Rossello *et al.* 2015).

1.4.2 Resistenzbestimmungen

Weitere Entwicklungsarbeiten konzentrieren sich auf die Anwendung von MALDI-TOF MS zur Bestimmung von ausgewählten Antibiotika-Resistenzen, wie etwa der Nachweis des Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder definierter β -Laktamasen bei *Enterobacteriaceae* (Ostergaard *et al.* 2015; Sparbier *et al.* 2012). Einen vielversprechenden Ansatz stellt die Bestimmung von Resistenzen gegen β -Laktamantibiotika dar, der auf einer direkten Überprüfung der entsprechenden bakteriellen Enzymaktivitäten beruht. Die enzymatische Spaltung des β -Laktamringes entspricht der Addition eines H_2O -Moleküls und führt zu einem Massenanstieg des Antibiotika-Moleküls um +18 Da. Diese Massenänderung kann bereits nach wenigen Stunden mittels MALDI-TOF MS einfach bestimmt werden (Kostrzewa *et al.* 2013). Resistenzen gegen verschiedene Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme konnten auf diesem Wege schon dargestellt werden (Sparbier *et al.* 2012). Eine routinemäßige Resistenzbestimmung gegen Antibiotika oder Antimykotika mit MALDI-TOF MS ist aktuell zwar noch nicht möglich, das Verfahren lässt sich jedoch problemlos mit den traditionellen manuellen oder automatischen Untersuchungsmethoden zur Resistenztestung kombinieren (Schubert und Wieser 2011).

1.4.3 Identifizierung oraler Mikroorganismen

Hinsichtlich der Bestimmung relevanter Keime einer Kariesinfektion fand das MALDI-TOF MS-Verfahren insbesondere bei der Identifikation der Spezies von Streptokokken der Mutans-Gruppe Anwendung (Goeke *et al.* 2018; Rupf *et al.* 2005). In einer weiteren Studie evaluierten Anderson und Mitarbeiter die Eignung der MALDI-TOF MS zur Differenzierung von oralen Bakterien der Gattung *Lactobacillus spp.* durch Vergleich mit einer PCR-basierten Methode (Anderson *et al.* 2014). Es konnte ferner gezeigt werden, dass Anaerobier im subgingivalen Biofilm von Patienten mit aggressiver Parodontitis durch vorherige Erstellung einer Referenzdatenbank mit Massenspektren bekannter Isolate identifizierbar sind. Zudem ermöglicht MALDI-TOF MS eine schnelle Differenzierung zwischen *P. intermedia* und *P. nigrescens*, welche mit konventionellen Methoden durchaus Zeit in Anspruch nimmt (Stingu *et al.* 2008). Auch Bakterienspezies der Gattung *Actinomyces spp.* in der subgingivalen Plaque ließen sich erfolgreich mit der

MALDI-TOF MS-Diagnostik einstufen (Stingu *et al.* 2015). In einer vor kurzem veröffentlichten Studie vergleichen Kist und Mitarbeiter zwei verschiedene Spülprotokolle zur Therapie von Zähnen mit endodontischen Infektionen. Hierbei konnten mittels MALDI-TOF MS insbesondere Bakterien der Gattung *Streptococcus spp.*, *Parvimonas spp.* und *Prevotella spp.* im Wurzelkanal identifiziert werden (Kist *et al.* 2016).

Die aufgeführten Studien heben die vielzähligen Anwendungsmöglichkeiten der MALDI-TOF MS hervor und verdeutlichen, dass sie bereits große Bewegung in die mikrobiologische Diagnostik gebracht hat.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

In dieser Studie soll untersucht werden, inwieweit sich das MALDI-TOF MS-Verfahren auch zur Diagnostik von parodontitisassoziierten Mikroorganismen eignet. Dazu soll die Bakterienflora aus parodontalen Taschen von an Parodontitis erkrankten Patienten analysiert werden. Neben einem zahnärztlichen Befund soll bei Patienten zunächst ein genauer Parodontalbefund erhoben werden. Des Weiteren soll eine zusätzliche Anamnese, insbesondere im Hinblick auf für das Krankheitsbild der Parodontitis wichtigen Faktoren (z.B. Tabakkonsum, Diabetes, parodontale Behandlungsmaßnahmen in der Vergangenheit) aufgenommen werden.

Nach der mikrobiologischen Probenentnahme mit sterilen Papierspitzen sollen die parodontalpathogenen Bakterien durch anaerobe Kulturmethode isoliert werden und anschließend soll eine Identifikation der Keime mittels MALDI-TOF MS erfolgen. Als Kontrolle soll das derzeit klinisch standardmäßig verwendete PCR-basierte Testkit (PariDent) zum Einsatz kommen.

Es wird die Hypothese aufgestellt, dass das offene System der MALDI-TOF MS eine präzise Identifikation einer Vielzahl verschiedener Bakterienspezies in der subgingivalen Plaque ermöglicht. So wird vermutet, dass im Vergleich zur molekularbiologischen Methode das nachgewiesene Keimspektrum der Proben weitaus differenzierter ausfällt.

In Anbetracht des Mangels an schnellen, sicheren und dabei kosteneffizienten Diagnostikmethoden, soll diese Studie einen Beitrag leisten zur Verbesserung der mikrobiologischen Diagnostik bei parodontalen Erkrankungen.

2 Material und Methode

Das folgende Kapitel erläutert alle Methoden, die für die Identifikation von parodontitisassoziierten Mikroorganismen mithilfe von MALDI-TOF MS und unter Verwendung des PCR-basierten Testkits PariDent erforderlich waren.

Zuerst wurden in einer klinischen Untersuchung der Patienten ein zahnärztlicher Befund und ein genauer Parodontalbefund erhoben. Darüber hinaus erfolgte eine zusätzliche Anamnese. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf für das Krankheitsbild der Parodontitis relevanten Faktoren gelegt.

Für die mikrobiologische Probenentnahme wurde jeweils eine sterile Papierspitze in die tiefste gemessene Zahnfleischtasche des jeweiligen Kieferquadranten eingeführt. Anschließend erfolgte die Isolierung der parodontitisassoziierten Bakterien aus der Patientenprobe durch anaerobe Kultur. Nach der Anzucht von Reinkulturen wurden die isolierten Keime sodann mithilfe von MALDI-TOF MS identifiziert. Für die Analyse der parodontalpathogenen Flora mittels PCR (PariDent) wurden zusätzlich an 4 weiteren Stellen nochmals 4 Papierspitzen als Probe gewonnen. Der molekularbiologische Nachweis erfolgte schließlich durch eine Isolation der bakteriellen DNA aus den Patientenproben mit darauffolgender Amplifikation der spezifischen DNA-Fragmente und Detektion mittels ELISA-Prinzip.

Die erhobenen Daten der Anamnese- und Befundbögen wurden anschließend deskriptiv ausgewertet. Des Weiteren erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse zwischen den beiden Diagnostikmethoden. Dazu wurde prozentual ausgewertet, wie oft die Ergebnisse der beiden Verfahren übereinstimmten. Um mögliche Zusammenhänge zwischen einzelnen klinischen Daten und dem ermittelten Keimspektrum darzustellen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Eine graphische Darstellung des Versuchsablaufs kann in Abbildung 2 entnommen werden.

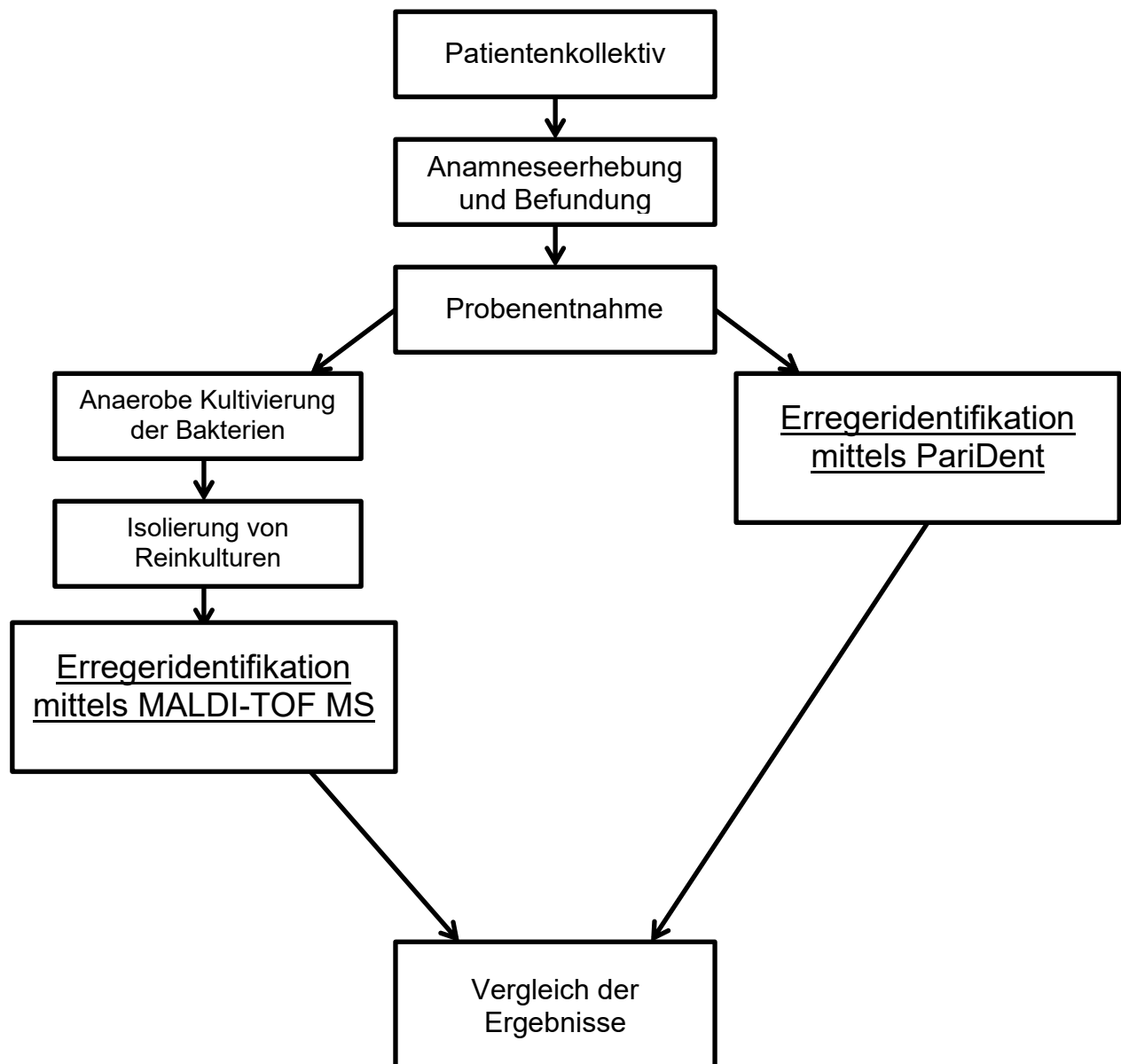


Abbildung 2: Graphische Darstellung des Studienablaufs

2.1 Patientenkollektiv

Der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität München wurde das Studienprotokoll zur Begutachtung vorgelegt. Diese bestätigte die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit (Nr. 178-16, Votum in Anhang 4).

Die Probandenrekrutierung erfolgte während des Zeitraumes von Mai bis September 2016 über die allgemeine Ambulanz der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Universität München. Prinzipiell eigneten sich alle Patienten als Probanden, bei denen eine Parodontitis diagnostiziert wurde (Sondierungstiefe an 4 Stellen mehr als 4 mm und Blutung auf Sondierung). So

wurden Patienten mit unterschiedlichen Verlaufsformen der Parodontitis in die Studie eingeschlossen. Ausschlusskriterien waren eine systemische oder lokale Antibiotikatherapie/Antiseptikatherapie in den letzten 6 Monaten, eine vorangegangene Bestrahlung oder Chemotherapie und eine aktuelle Immunsuppression, z.B. nach Organtransplantation. Nicht mit einbezogen wurden ferner Patienten mit Tumorerkrankungen und schweren Allgemeinerkrankungen. Dies bezog sich in erster Linie auf bekannte Infektionskrankheiten wie HBV, HCV, HIV und TBC aus Gründen des IfSG bei der Probenverarbeitung.

Die Festlegung der Fallzahl erfolgte aufgrund des Studiendesigns ohne Kontrollgruppe in Anlehnung an ähnliche Studien (Jervoe-Storm *et al.* 2005; Stingu *et al.* 2008). Schließlich ergab sich daraus ein Patientenkollektiv von 39 Patienten. Diese Patientenzahl wurde für die Evaluation der Eignung von MALDI-TOF MS zur Diagnostik von parodontitisassoziierten Mikroorganismen als angemessen angesehen und sollte innerhalb von 6 Monaten erreicht werden.

2.2 Anamneseerhebung und Befundung

Nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung und Einwilligung des Patienten zur Teilnahme an der Studie erfolgte zunächst eine genaue Befragung anhand eines standardisierten Anamnesebogens. Ein Muster der Patienteninformation, der Einwilligungserklärung und des Anamnesebogens befindet sich im Anhang (Anhänge 1 und 2). Dabei galt es den gegenwärtigen oder vergangenen Zigarettenkonsum, Angaben zur Medikamenteneinnahme sowie zu parodontalen Behandlungsmaßnahmen in der Vergangenheit zu erfragen. Weitere Fragen bezogen sich unter anderem auf die Familienanamnese und auf die Manifestation von systemischen Erkrankungen, die im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Parodontitis stehen (Diabetes mellitus, Osteoporose, Atherosklerose, Bluterkrankungen). Im Anschluss daran wurde ein zahnärztlicher Befund erhoben, um die aktuellen oder bisherigen Erkrankungen in der Mundhöhle zu vermerken (kariöse Läsionen, Perkussionsempfindlichkeit, erneuerungsbedürftiger Zahnersatz etc.). Zudem wurde ein genauer Parodontalbefund erstellt. Dazu wurde mit einer PCP 12-Sonde (Parodontometer PCP126; Hu-Friedy Mfg., Frankfurt am Main, Deutschland) an 6 Stellen pro Zahn die Taschensondierungstiefe (TST) gemessen und beobachtet, ob nach der Sondierung eine Blutung vorlag (Bleeding on

probing, BOP). Außerdem wurde der Lockerungsgrad eines jeden Zahnes und an 6 Stellen pro Zahn die Rezessionen, so vorhanden, festgehalten. Der Furkationsbefall im Seitenzahnbereich wurde mit einer Nabers-Sonde (Bifurkationssonde Nabers PQ2N; Hu-Friedy Mfg. Co., LLC., Frankfurt am Main, Deutschland) ermittelt. Anschließend konnte die Anzahl der behandlungsbedürftigen Stellen notiert werden, die entweder durch eine TST von 4 mm mit BOP, oder durch eine TST > 4 mm mit oder ohne BOP gekennzeichnet waren (Mombelli 2005; Mombelli *et al.* 2015). Die Zahl der behandlungsbedürftigen Zähne, die sich durch die Präsenz von mindestens einer behandlungsbedürftigen Stelle auszeichneten, wurde ebenfalls festgehalten. Ein Muster des Befundbogens kann Anhang 3 entnommen werden.

2.3 Probenentnahme

Die Gewinnung der subgingivalen Plaqueproben erfolgte an der tiefsten und an der zweittiefsten gemessenen Zahnfleischtasche eines jeden Kieferquadranten. Die tiefste gemessene parodontale Tasche eines jeden Quadranten wurde dabei abwechselnd für die MALDI-TOF MS-Diagnostik und für die Keimbestimmung mittels PariDent gewählt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass für beide Diagnostikmethoden dieselben Voraussetzungen bezüglich der Identifikation der Parodontopathogene gelten.



Abbildung 3: Entnahme der subgingivalen Plaqueprobe

Zunächst erfolgte eine supragingivale Reinigung sowie eine Trocknung der entsprechenden Zähne mit dem Luftpuster. Anschließend wurde für die Entnahme der Plaqueproben jeweils eine sterile Papierspitze (ISO-Größe 40) in die jeweilige Zahnfleischtasche eingeführt, bis zum Taschenfundus vorgeschoben und dort 10 Sekunden belassen (Abbildung 3). Daraus ergeben sich sowohl für die Keimbestimmung mittels MALDI-TOF MS als auch für die Erregeridentifikation mithilfe von PariDent jeweils 4 Papierspitzen, die sofort in ein Eppendorf-Gefäß zur temporären Lagerung gegeben wurden. Hierbei wurden die Papierspitzen, die für den PariDent-Test bestimmt waren, gemeinsam in ein leeres Eppendorf-Gefäß gelegt und anschließend bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert (Abbildung 4). Für die Analyse mittels MALDI-TOF MS wurden die Papierspitzen in 500 µl eines Transportmediums (VMG-II, Möller, 1966) gegeben (Abbildung 5). Das entsprechende Medium verhindert nicht nur das Wachstum der entnommenen anaeroben Bakterien, sondern auch deren Absterben und ermöglicht dadurch eine Kultivierung der Erreger (Syed und Loesche 1972).



*Abbildung 4: Plaqueproben für
PariDent-Test*



*Abbildung 5: Plaqueproben für
MALDI-TOF MS*

2.4 Erregeridentifikation mittels MALDI-TOF MS

Für die Identifikation der entnommenen parodontitisassoziierten Mikroorganismen mithilfe der MALDI-TOF MS erfolgte zunächst eine anaerobe Kultivierung der

Bakterien auf 2 verschiedenen nicht selektiven Nährböden. Nachdem unterschiedliche Kolonien auf den Nährböden gewachsen waren, galt es Reinkulturen herzustellen, um die Entstehung von gemischten Massenspektren bei der MALDI-TOF MS-Diagnostik zu vermeiden. Im Anschluss daran wurde ein kurzer Extraktions-Schritt durchgeführt, um die ribosomalen Proteine der Bakterienkolonie der Analyse zugänglich zu machen.

2.4.1 Bakterienisolierung in der anaeroben Kammer

Alle Arbeitsschritte, die zur Isolierung, Kultivierung und Stammerhaltung der Bakterien nötig waren, wurden in einer anaeroben Kammer durchgeführt (Bactron II-2E; Shellab, OR, USA, Serien-Nr. 0200202, Abbildung 6).

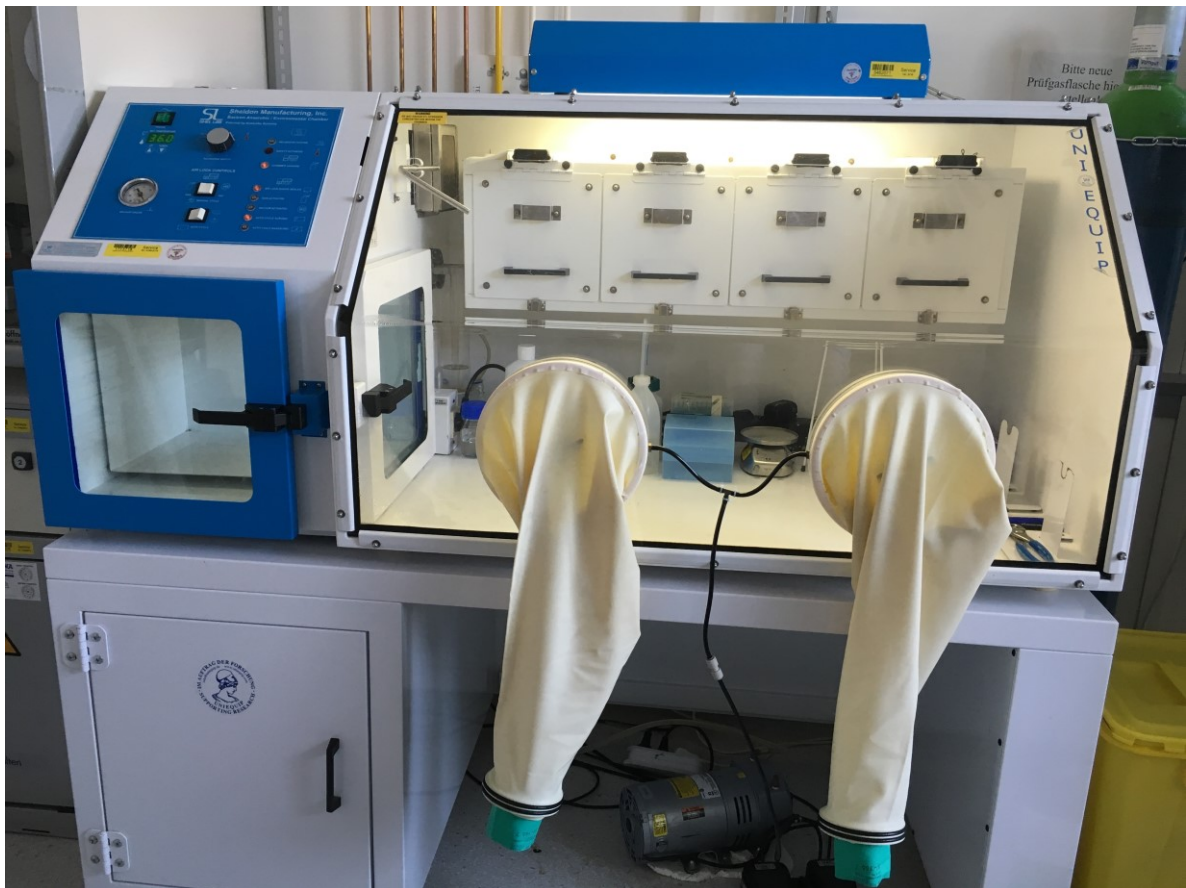


Abbildung 6: Anaerobe Kammer

Die anaeroben Bakterienkulturen wurden darin bei einer Temperatur von 37 °C und einer Atmosphäre aus 85% Stickstoff, 10% Kohlenstoffdioxid und 5% Wasserstoff inkubiert. Das jeweilige Milieu konnte dabei durch das Fluten der Kammer mit dem speziellen Gasmisch (Linde AG, Unterschleißheim, Deutschland) hergestellt werden. Jedes Mal wurde zu Beginn eines jeden

Arbeitsschrittes in der Kammer ein Katalysator gewechselt, der zuvor in einem Ofen auf 180 °C aufgeheizt wurde. Das im Katalysator befindliche Palladium bindet den womöglich in die Kammer eingedrungenen freien Sauerstoff. Dieser reagiert letztendlich mit dem Wasserstoff aus dem Gasgemisch der Kammer zu Wasser. Des Weiteren wurde das gewünschte sauerstoffarme Milieu durch die Verwendung von GasPaks (GasPak EZ Anaerobe Container System; BD, New Jersey, USA) aufrechterhalten. Diese Papierpäckchen enthalten als Reagenzien anorganische Karbonate, Aktivkohle, Ascorbinsäure und Wasser. Durch Luftkontakt wird das Päckchen aktiviert und kann somit die Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre reduzieren. Die anorganischen Karbonate entwickeln ferner Kohlenstoffdioxid. So produzieren die GasPaks zur Kultivierung anaerober Bakterien innerhalb von 2,5 Stunden nach deren Aktivierung eine anaerobe Atmosphäre, die innerhalb von 24 Stunden eine Sauerstoffkonzentration von weniger als 1,0% aufweist. Ungefähr einmal pro Woche wurden 2 neue GasPaks in die anaerobe Kammer gelegt und ausgetauscht. Außerdem wurden zur Kontrolle des sauerstoffarmen Milieus in der Kammer Indikator-Teststreifen (BBL Dry Anaerobic Indicator Strips; BD, NJ, USA) verwendet. Diese wurden durch Benetzung mit destilliertem Wasser aktiviert.

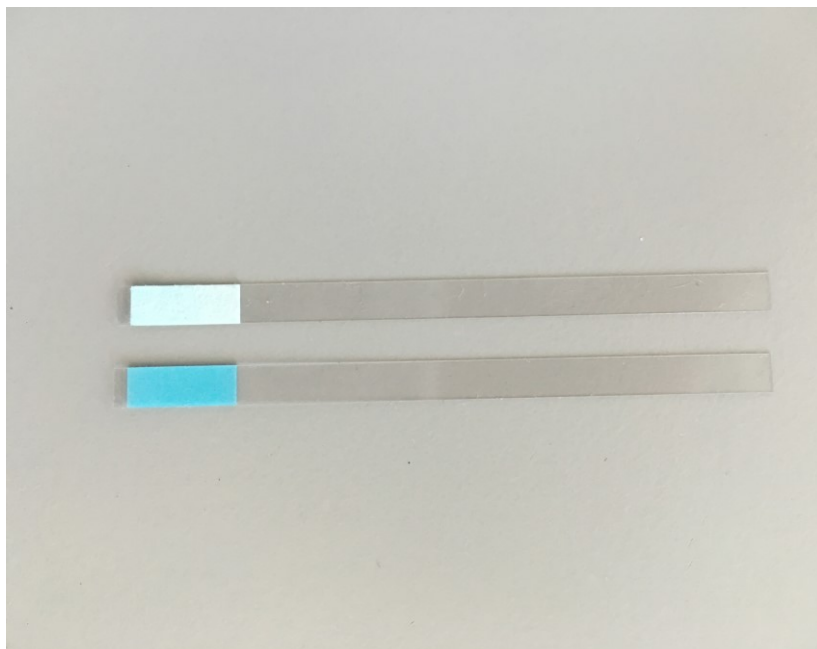


Abbildung 7: Anaerobe Indikator-Teststreifen

Abbildung 7 veranschaulicht, dass bei ausreichender anaerober Umgebung deren blauer Abschnitt nach wenigen Stunden reduziert (weiß) erschien.

2.4.2 Kultivierung der Bakterien

Zunächst mussten die für den Nachweis bestimmten parodontitisassoziierten Mikroorganismen aus der Gesamtflora der subgingivalen Plaque isoliert werden. Zur Anzucht der Bakterien wurden Festnährmedien verwendet. Gewählt wurden dabei Schädler Agar (Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood; BD, NJ, USA) und bei den ersten 5 Patientenproben zusätzlich Brucella Agar (Brucella 5% Sheep Blood Agar with Hemin, Vitamin K1; BD, NJ, USA). Die genaue Zusammensetzung der Nährmedien ist Anhang 5 zu entnehmen.

Damit sich die gewonnenen Bakterien der subgingivalen Plaque aus den Papierspitzen lösen und gleichmäßig in dem Transportmedium verteilen, wurde dieses zuerst 30 Sekunden gevortext. Danach erfolgte eine serielle Verdünnung des Mediums. Dazu wurden in 5 Eppendorf-Gefäße jeweils 900 µl 0,9%-ige Natriumchloridlösung (Isotonische Kochsalzlösung, Injektionslösung; Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) pipettiert. Durch Zugabe von jeweils 100 µl des Transportmediums bzw. der vorausgehenden Verdünnung wurde eine Verdünnungsserie von 1:10 bis 1:10⁵ vorgenommen. Dadurch konnte die Koloniezahl auf den Agarplatten reduziert werden, was wiederum das Abimpfen von einzelnen Bakterien zur Herstellung von Reinkulturen möglich machte. Alle Verdünnungen wurden im Anschluss 10 Sekunden gevortext, um eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien in der Kochsalzlösung zu gewährleisten. 100 µl jeder Verdünnung wurden mit einem Spatel sowohl auf 2 Schädler-Agarplatten als auch auf 2 Brucella-Agarplatten ausplattiert, sodass sich daraus insgesamt 4 Platten pro Verdünnung und 24 Platten pro Patientenprobe ergaben. Diese wurden sodann individuell, je nach Wachstum der Parodontopathogene, für 48 bis zu 96 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C in einer dafür vorgesehenen Kammer, die sich in der anaeroben Bank befindet, inkubiert.

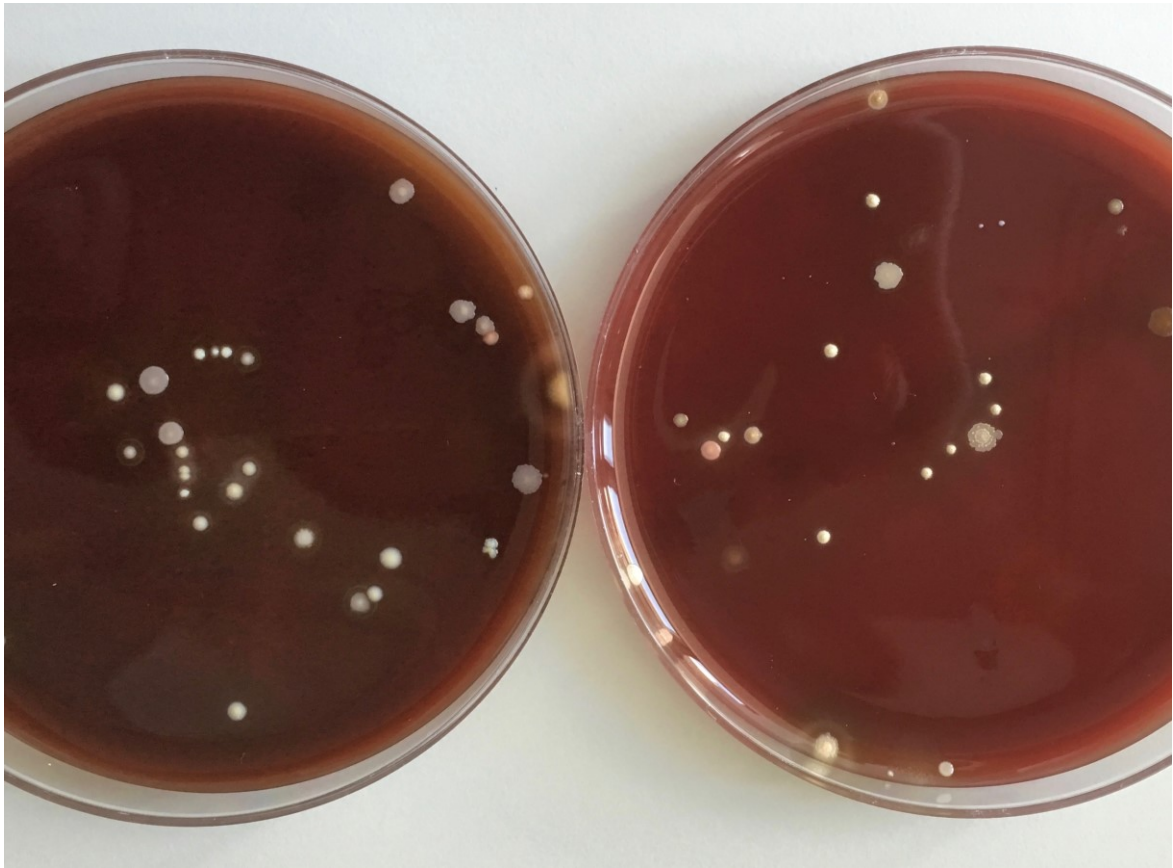


Abbildung 8: Bakterienkulturen auf Brucella Agar (links) und Schädler Agar (rechts)

Abbildung 8 zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Wachstums der Mikroorganismen auf den Schädler- und Brucella-Platten erkennbar waren. Aufgrund dessen wurde nach den ersten 5 Patientenproben entschieden, alle folgenden Proben ausschließlich auf Schädler-Platten auszuplattieren.

2.4.3 Isolierung von Reinkulturen

Nachdem morphologisch unterschiedliche Kolonien auf den jeweiligen Nährmedien gewachsen waren, galt es Reinkulturen herzustellen. Die Bakterien wurden dazu anhand morphologischer Kriterien wie Form, Farbe, Hofbildung und Größe unterschieden. Einzelne Kolonien wurden mit einer Impföse von der Agarplatte isoliert und nach der Dreifelderausstrich-Methode auf eine neue Platte ausgestrichen. Dabei eigneten sich zur Isolierung der einzelnen Bakterien die Verdünnungen $1:10^4$ und $1:10^5$ am besten. Zur Anzucht von Einzelkolonien wurden ausschließlich Schädler-Agarplatten verwendet. Diese wurden ebenfalls bei einer Temperatur von 37 °C und einer Atmosphäre aus 85% Stickstoff, 10%

Kohlenstoffdioxid und 5% Wasserstoff inkubiert. Die nach ca. 48 Stunden neu gewachsenen Keime wurden optisch begutachtet, um zu kontrollieren, ob es sich um Reinkulturen handelte (Abbildungen 9 und 10).

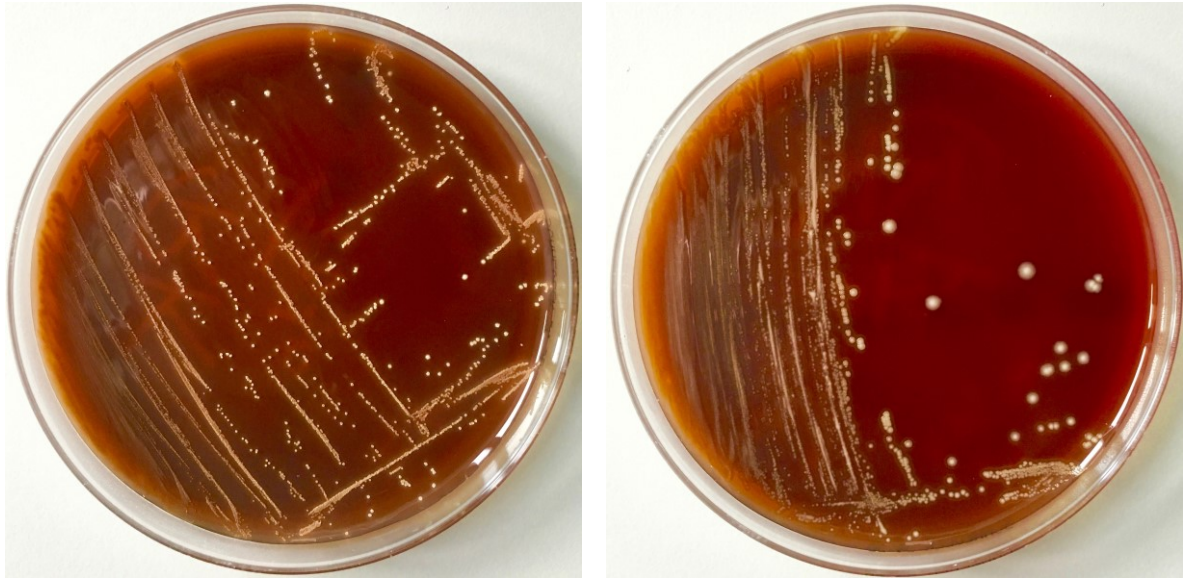


Abbildung 9 und 10: Isolierte Reinkulturen

Da die Einzelkolonien für die Identifikation mittels MALDI-TOF MS möglichst frisch sein sollten, wurde besonders darauf geachtet, dass diese nicht älter als 48 Stunden waren. Mit zunehmendem Alter der Kolonien werden die ribosomalen Proteine der Bakterien degradiert. Schließlich gehen daraus Massenspektren hervor, die schwächer und weniger differenziert ausfallen. Dies führt wiederum zu Problemen beim Datenbankabgleich und zu schlechteren Differenzierungsergebnissen (Wieser *et al.* 2012). So wurden die isolierten Reinkulturen 2 Tage vor der MALDI-TOF MS-Diagnostik mit einer Impföse auf neue Schädler-Platten überimpft und erneut inkubiert, um den Erhalt der ribosomalen Proteine der Erreger zu gewährleisten.

2.4.4 Extraktion von ribosomalen Proteinen

Um die ribosomalen Proteine der MALDI-TOF MS-Analyse zugänglich zu machen, stehen verschiedene Extraktions-Protokolle zur Verfügung. So kann eine Zellyse unter anderem durch das Pipettieren von 70%-iger Ameisensäure auf die zu untersuchende Einzelkolonie realisiert werden (Haigh *et al.* 2011). Deutlich häufiger lassen sich korrekte Identifikationen der Bakterienspezies jedoch durch einen Extraktions-Schritt mittels Ethanol erzielen (Bizzini *et al.* 2010). Die zu

untersuchenden Reinkulturen wurden hierfür nach einem speziellen Protokoll aufbereitet, sofern durch das direkte Pipettieren von 70%-iger Ameisensäure auf die Einzelkolonien keine ausreichend validen Ergebnisse erreicht wurden.

Zunächst wurde mit einer Impföse eine ca. streichholzkopf-große Menge des Keims von der Agarplatte aufgenommen und in 300 µl H₂O-dest, vorgelegt in einem Eppendorf-Gefäß, eingerieben. Um eine ausreichend homogene Verteilung des Erregers sicherzustellen, wurde das Eppendorf-Gefäß im Anschluss gevortext. Danach erfolgte die Zugabe von 900 µl Ethanol absolut (Ethanol reinst; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), das Gefäß wurde erneut gut gevortext und schließlich 120 Sekunden bei 14000 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute, rpm) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Eppendorf-Gefäß sodann auf Zellstoff ausgeklopft und danach ein weiteres Mal für 120 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Eppendorf-Gefäß wurde nachfolgend für ca. 60 Sekunden offen stehen gelassen, damit das restliche Ethanol verdampfen konnte. In Abhängigkeit von der entstandenen Pelletgröße wurden 10 - 50 µl 70%-ige Ameisensäure (Formic acid solution; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) hinzupipettiert und das Pellet darin resuspendiert. Anschließend wurde die gleiche Menge Acetonitril (Acetonitril 100%; Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland) hinzugegeben, gevortext und schlussendlich für 120 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun die ribosomalen Zielproteine für die Analyse mithilfe von MALDI-TOF MS. So konnte 1 µl dieses Überstands nun auf die MALDI-Targetplatte aufgetragen werden. Dieser Überstand war gekühlt bei einer Temperatur von 4 °C ca. 24 Stunden haltbar.

Durch diesen Extraktions-Schritt lassen sich meist um ein Vielfaches klarere und vielschichtigere Spektren erzeugen als durch das direkte Aufstreichen der Bakterienkolonie auf die Targetplatte. Dadurch wird eine erfolgreiche Datenbanksuche letztendlich ermöglicht.

2.4.5 Prinzip der MALDI-TOF MS-basierten Speziesbestimmung

Die Speziesbestimmung der parodontitisassoziierten Mikroorganismen wurde im Max-von-Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

(Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Prof. Dr. Sören Schubert) durchgeführt (Abbildung 11).



Abbildung 11: MALDI-TOF MS-Gerät

Nachdem eine kleine Menge der extrahierten ribosomalen Proteine einer Bakterienkolonie auf die Analysenposition der MALDI-Targetplatte aufgebracht wurde, galt es zunächst die Probe einzubetten. Dazu wird im Allgemeinen 1 μ l einer Matrixlösung auf die Probe pipettiert, die mit dem Erreger auf der Stahloberfläche der Targetplatte kokristallisiert. Es bildet sich schließlich ein Mischkristall aus Anteilen der mikrobiologischen Probe und der organischen Matrix. Die beladene MALDI-Probenplatte kann nun in die Messkammer des Massenspektrometers eingeführt werden, in der kontinuierliches Hochvakuum herrscht. Hierfür sind spezielle Vakuumpumpen im Einsatz, die die beim Beladevorgang eingedrungene Luft unmittelbar wieder abpumpen. In der Messkammer werden die einzelnen Probenfelder auf der Targetplatte angesteuert, die dann mehreren kurzen Laserpulsen ausgesetzt sind. Der Laser sprengt letztendlich die Gitterstruktur des Mischkristalls und bewirkt dadurch eine Ionisierung der Erregerproteine (Kayser *et al.* 2014). Die ionisierten Analytmoleküle (Proteine) werden anschließend in einem starken elektrischen Feld einer Hochspannungsquelle mit 10 - 30 Kilovolt (kV) beschleunigt. Die positiv geladenen Proteine werden sodann in ein Hochvakuum-Flugrohr injiziert, das am

anderen Ende einen negativ geladenen Detektor aufweist. Die Flugzeit bis zum Auftreffen der Analyten auf dem Detektor wird exakt gemessen, wobei sowohl der Ionisierungsgrad als auch die Masse der Proteine darauf Einfluss nehmen. Schließlich ergibt sich bei jedem Erreger ein charakteristisches Spektrum, das einen massenspektrometrischen Fingerabdruck darstellt. Zur Identifizierung eines Erregers eignet sich besonders das Spektrum zwischen 2 und 12 Kilodalton (kDa), das dem Massespektrum positiv geladener ribosomaler Proteine entspricht und kaum von den Wachstumsbedingungen eines Mikroorganismus beeinflusst wird (Wieser *et al.* 2012).

Die vom MALDI-TOF MS-Gerät (MALDI-TOF MS; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) gemessenen Massenspektren werden vollautomatisch mit einer im System integrierten Referenzdatenbank abgeglichen, das Spektren einer Vielzahl humanmedizinisch relevanter Bakterien enthält. Da der Software-Vergleich (MALDI Biotyper V3.1; Bruker Daltonik GmbH) der gemessenen Massenspektren mit den hinterlegten Spektren in der Datenbank niemals genau identische Messwerte ergeben kann, wird die Validität des Differenzierungsergebnisses durch einen Zahlenwert (score-value) beschrieben. Dieser Zahlenwert kann Werte zwischen 0 und 3 annehmen, wobei ein score > 2 eine sehr sichere Identifikation repräsentiert. Über eine Computerverbindung können die Ergebnisse direkt in die Labor-EDV überspielt werden. Eine graphische Darstellung des Arbeitsablaufs der MALDI-TOF MS-basierten Speziesbestimmung von Mikroorganismen kann in Abbildung 12 entnommen werden.

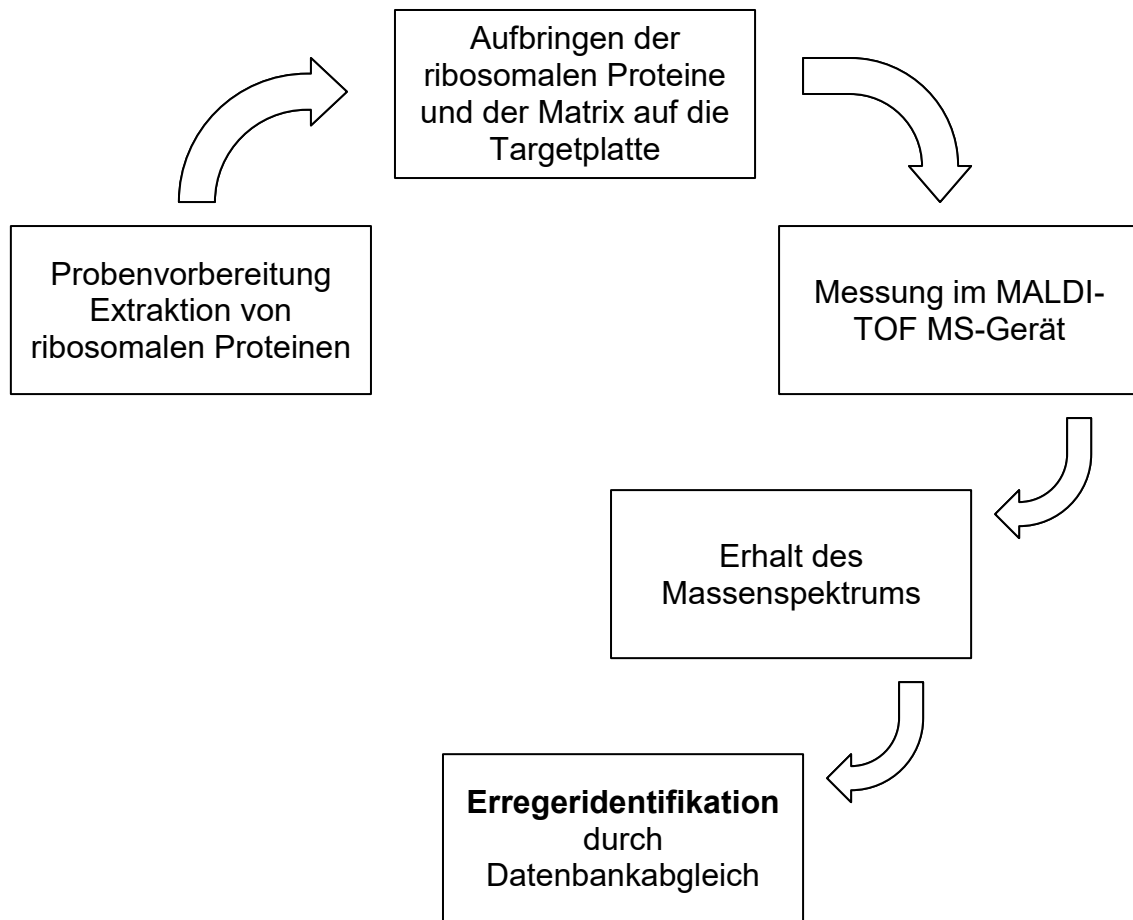


Abbildung 12: Graphische Darstellung des Arbeitsablaufs der MALDI-TOF MS-basierten Speziesbestimmung

Um die Plausibilitätskontrolle des Differenzierungsergebnisses zu erleichtern, gibt die im System integrierte Software sowohl das beste Ergebnis mit einer sehr sicheren Zuordnung der korrekten Spezies als auch weitere Ergebnisse mit niedrigeren score-values an.

2.4.5.1 Einbettung der Proben auf der MALDI-Targetplatte

Da die MALDI-TOF MS ein sehr sensitives Verfahren darstellt, wurde nur eine sehr geringe Menge der ribosomalen Proteine auf die MALDI-Targetplatte aufgetragen. So wurde, wie bereits beschrieben, 1 µl des extrahierten Überstands auf eine ca. 6 mm durchmessende Analysenposition der Probenplatte aufgebracht. Anschließend wurde auf das Analyt 1 µl eines Zimtsäurederivats (α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure; Sigma-Aldrich) als organische Matrix pipettiert, getrocknet und die Probe dadurch eingebettet. Die chemische Strukturformel der Matrixlösung kann Abbildung 13 entnommen werden.

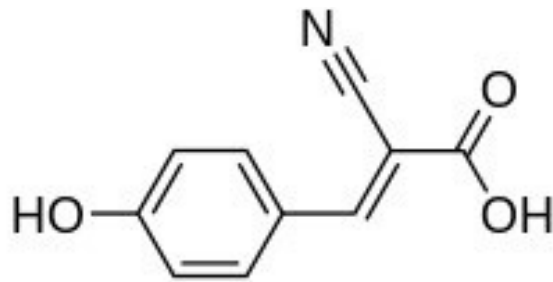


Abbildung 13: α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure; $C_{10}H_7NO_3$

Auf die MALDI-Targetplatte aus Metall mit insgesamt 96 Analysenpositionen wurde jede Probe doppelt aufgetragen, sodass letztendlich 48 Erreger pro Target identifiziert werden konnten (Abbildung 14).

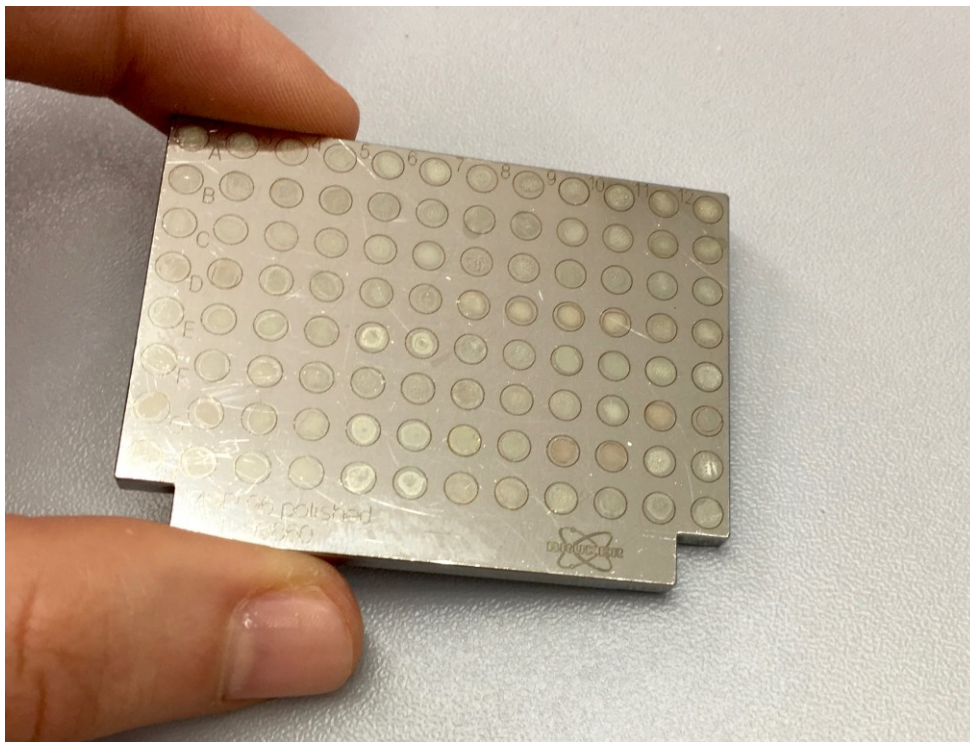


Abbildung 14: MALDI-Targetplatte mit aufgetragenen Proben

2.4.5.2 Messung und Datenbankabgleich der Massenspektren

Die beladenen Targetplatten wurden nun in die Messkammer des MALDI-TOF MS-Gerätes eingeführt und nach Aufbau eines Hochvakuum vollautomatisch gemessen. Abbildung 15 veranschaulicht nochmals die genauen Abläufe im Massenspektrometer, die schließlich zum Erhalt der für die Erreger charakteristischen Massenspektren führten.

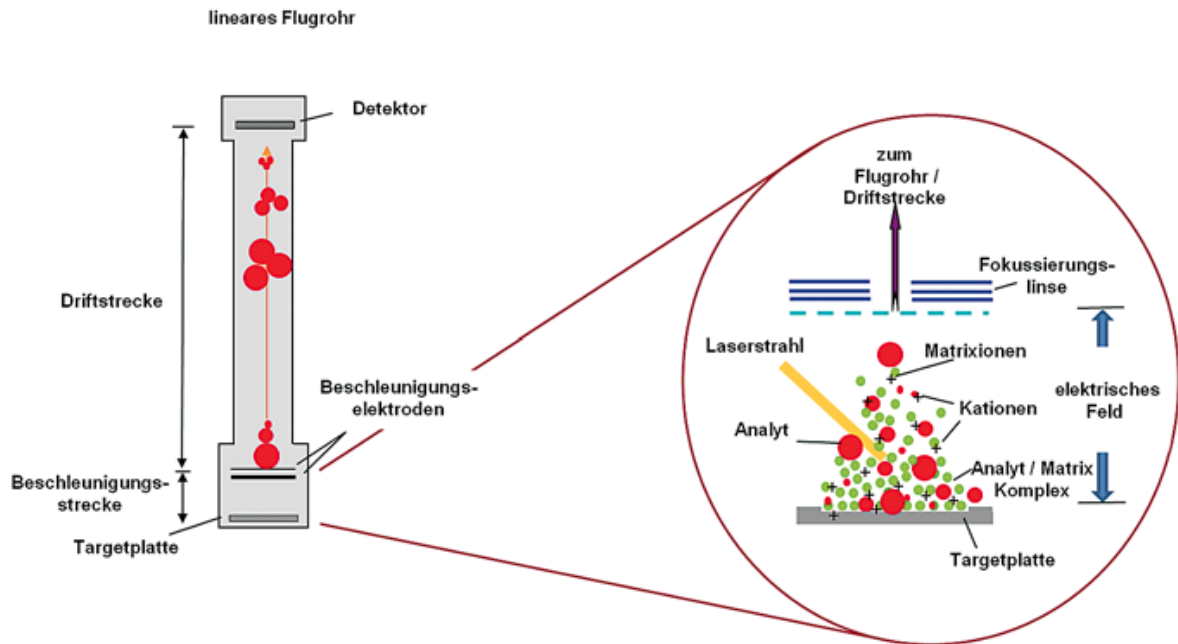


Abbildung 15: Prinzip der MALDI-TOF MS-basierten Entstehung spezies-spezifischer Massenspektren (Schubert und Wieser, 2010)

Daraufhin erfolgte der Software-basierte Abgleich der ermittelten Spektren mit der Referenzdatenbank ohne Zeitverlust und vollautomatisiert dank Algorithmen, die auf statistischen Methoden beruhen (Jarman *et al.* 2000). Seng und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Datenbank mind. 10 Referenzspektren für eine Spezies enthalten muss, um eine korrekte Identifikation eines Mikroorganismus mittels MALDI-TOF MS zu erzielen (Seng *et al.* 2009). Die schlussendlich angegebenen score-values beruhen dabei auf der Übereinstimmung des ermittelten Massenspektrums mit den Referenzspektren im Allgemeinen, auf der Übereinstimmung der Lokalisation der Massenspitzen (Peaks) sowie auf der Übereinstimmung der Höhe der Peaks (Veloo *et al.* 2011).

2.4.6 Stammerhaltung der Keime

Um eine Stammerhaltung der anaeroben Mikroorganismen sicherzustellen, wurde mit einer Impföse eine gut sichtbare Menge der jeweiligen Kolonie von der Agarplatte aufgenommen und in ein Cryo-Röhrchen (Cryo.s, PP, mit Schraubverschluss, steril; Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland), gefüllt mit 1000 µl eines Mediums, überführt. Es handelte sich dabei um Brain Heart Infusion (Brain Heart Infusion Broth (BHI); Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zu welchem 10% Glycerin (Glycerin; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) pipettiert wurden, um eine Beschädigung der

bakteriellen Zellmembran beim Einfrierprozess zu vermeiden. Die Lösung wurde mit einer 100 µl -Pipette mehrmals resuspendiert, sodass sich die Mikroorganismen gut in dem Medium verteilten. Alle Keime wurden zunächst bei einer Temperatur von -20 °C doppelt eingefroren. Nach einer Woche wurden die Cryo-Röhrchen schließlich bei -196 °C gelagert.

2.5 Erregeridentifikation mittels PariDent

Als Kontrollgruppe zur Identifikation von parodontitisassoziierten Mikroorganismen mithilfe von MALDI-TOF MS wurde das derzeit klinisch standardmäßig angewandte Testkit PariDent (PariDent; Amplex Diagnostics GmbH, Gießen, Deutschland) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Multiplex-PCR-System zum qualitativen in vitro Nachweis von folgenden 7 parodontopathogenen Bakterienspezies: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. micra*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola* und *F. nucleatum*.

Das Testprinzip beruht zunächst auf der Isolation der bakteriellen DNA aus den Patientenproben. Im Anschluss daran erfolgt die Amplifikation der spezifischen DNA-Fragmente mittels PCR. Das PariDent-Testsystem enthält dabei Reagenzien sowohl für eine sogenannte PAF-PCR als auch für eine PMT-PCR. Beide PCR-Ansätze beziehen sich auf die Amplifikation von DNA-Fragmenten von 2 unterschiedlichen Bakteriengruppen. In Tabelle 1 wird verdeutlicht, welche Mikroorganismen mit der PAF-PCR bzw. der PMT-PCR detektiert werden können.

PAF-PCR	<i>P. gingivalis</i>
	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
	<i>F. nucleatum</i>
PMT-PCR	<i>T. forsythia</i>
	<i>P. intermedia</i>
	<i>P. micra</i>
	<i>T. denticola</i>
	interne Kontrolle

Tabelle 1: PariDent PAF/PMT-PCR

Dies bedeutet, dass die isolierte DNA einer jeden Patientenprobe einer PCR sowohl mit PAF-Reagenzien als auch mit PMT-Reagenzien unterzogen wird. Die spezifischen Amplifikate der verschiedenen Bakterienspezies können anschließend mit den im Testsystem enthaltenen Sonden (Hybridisierungsmodule) visualisiert werden und schlussendlich mittels ELISA-Prinzip detektiert werden.

Die Extinktionen der einzelnen Kavitäten der Hybridisierungsmodule werden hierbei in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Positive Signale zeigen die spezifische Amplifikation bestimmter DNA-Bereiche während der PariDent-PCR an und bestätigen somit das Vorhandensein der entsprechenden parodontalpathogenen Bakterienspezies in der zu analysierenden Probe. Abbildung 16 veranschaulicht nochmals den Aufbau des PariDent-Testkits.



Abbildung 16: PariDent-Testkit

2.5.1 DNA-Isolation

Die Isolation der bakteriellen DNA aus den Patientenproben erfolgte mithilfe des MagNA Pure LC Systems (MagNA Pure LC 2.0 System; Roche Deutschland Holding GmbH, Penzberg, Deutschland). Dies ist ein vollautomatisches System für die Extraktion von Nukleinsäuren aller Art und kann in einem Durchgang bis zu 32 Proben extrahieren. Das MagNA Pure LC System nutzt zur Nukleinsäureisolierung magnetische Silikatpartikel, die einen Eisenkern mit aufkristallisiertem Magnetit besitzen und von einer Glasschicht umgeben sind. Da Nukleinsäuren die Eigenschaft besitzen sich bei hohen Salzkonzentrationen bzw. Ionenstärken an

Glas anzulagern, ist es mithilfe eines Magneten möglich, die magnetischen Silikatpartikel und die daran gebundenen Nukleinsäuren aus einer Lösung zu isolieren. Mittels Guanidiniumsalzen in hoher Konzentration und Proteinase K wird zunächst eine ausreichende Zelllyse gewährleistet. Die nun frei zugänglichen Nukleinsäuren binden sich an die magnetischen Silikatpartikel und können mithilfe eines am Pipettierarm des Gerätes befindlichen Magneten von einer Waschlösung zur nächsten transportiert werden. Durch die einzelnen Waschschrte können die an den Partikeln anhaftenden Verunreinigungen entfernt werden. Im letzten Schritt werden die magnetischen Silikatpartikel in einem Medium mit geringer Ionenstärke inkubiert, sodass sich die Nukleinsäuren von den Partikeln wieder ablösen. Zu guter Letzt werden mit dem Magneten die Silikatpartikel beseitigt und man erhält eine Lösung mit gereinigten Nukleinsäuren.

Zur Isolation der bakteriellen DNA wurden die Reagenzien des MagNA Pure LC DNA Testkits (MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi); Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet (Abbildung 17). Zuerst wurden in jedes Eppendorf-Gefäß, in dem sich die subgingivalen Plaqueproben (4 Papierspitzen) befanden, 195 µl Lysis-Puffer und 30 µl Proteinase K pipettiert. Die Proteinase K wurde zuvor durch die Zugabe von 1,2 ml Elutions-Puffer aktiviert und 30 Sekunden gevortext. Die Eppendorf-Gefäße wurden daraufhin für 10 min bei einer Temperatur von 65 °C im Wasserbad inkubiert und für weitere 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert und kurz auf Eis gelegt. 100 µl einer jeden Probe wurden sodann in das MagNA Pure LC Analysenmodul pipettiert.



Abbildung 17: MagNA Pure LC DNA Testkit

Die MagNA Pure LC Software wurde gestartet und das Protokoll „DNA Bacteria III“ gewählt. Danach wurde das MagNA Pure LC Gerät mit den Einweg-Verbrauchsmaterialien aus Plastik und den benötigten Reagenzien, gemäß der Vorgaben der Software, beladen. Zu den für den Isolationsprozess erforderlichen Reagenzien zählten 3 verschiedene Wasch-Puffer, der Lysis-Puffer, der Elutions-Puffer und die magnetischen Silikatpartikel, die unmittelbar vor Beginn des Isolationsprozesses 20 Sekunden gevortext wurden. Nachdem alle Anweisungen der Software befolgt wurden und schließlich das Probengefäß in das Gerät gestellt wurde, konnte nun der Isolationsvorgang gestartet werden. Abbildung 18 zeigt das beladene MagNA Pure LC Gerät mit allen Einweg-Verbrauchsmaterialien und der erforderlichen Menge an Reagenzien, die nach Definition des Probenvolumens automatisch von der Software berechnet wurde.

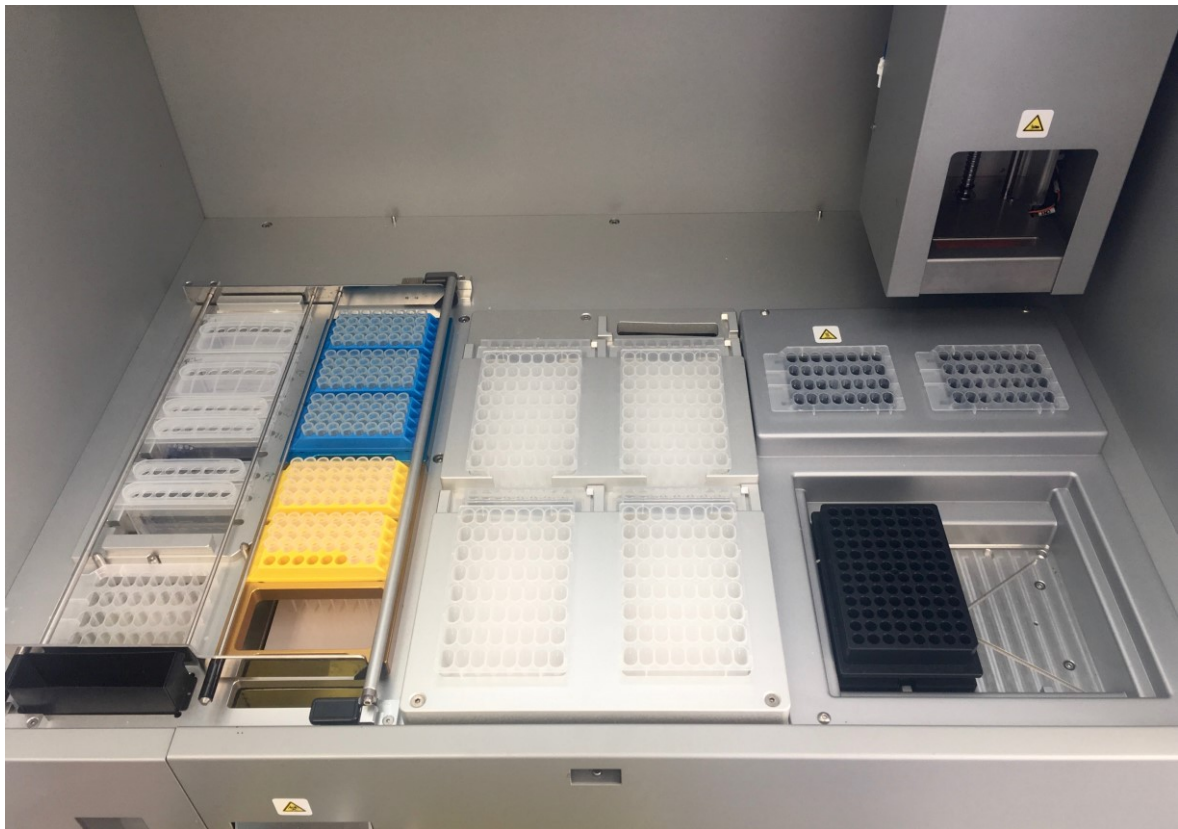


Abbildung 18: Beladenes MagNA Pure LC System

Nach dem Isolationsprozess wurde das Probengefäß mit der isolierten bakteriellen DNA aus dem Gerät genommen und konnte nun bei einer Temperatur von -20 °C gelagert werden.

2.5.2 PariDent PAF/PMT-PCR

Für die Amplifikation der isolierten bakteriellen DNA-Fragmente wurden die Proben und alle erforderlichen Reagenzien des PariDent-Testkits zunächst auf Eis gelegt. Dann wurde sowohl für die PAF-PCR als auch für die PMT-PCR ein sogenannter „Master Mix“ auf Eis vorbereitet, dessen Zusammensetzung in Tabelle 2 entnommen werden kann. Bei der Herstellung des „Master Mix“ wurde die DNA-Polymerase immer als letztes Reagens hinzupipettiert.

PAF-Master Mix für 1 Probe	PMT-Master Mix für 1 Probe
1 µl dNTPs	1 µl dNTPs
1 µl PAF Primer	1 µl PMT Primer
5 µl PCR Puffer	5 µl PCR Puffer
36 µl H ₂ O-bidest	36 µl H ₂ O-bidest
2 µl Tth DNA-Polymerase	2 µl Tth DNA-Polymerase
45 µl total	45 µl total

Tabelle 2: Herstellung des PAF/PMT-Master Mix

Nach der Herstellung des „Master Mix“ wurde das Eppendorf-Gefäß für 20 Sekunden gevortext und für weitere 20 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert, um eine gleichmäßige Verteilung der einzelnen Reagenzien in der Lösung zu gewährleisten. Jeder „Master Mix“ wurde sodann in ein PCR-Tube überführt und 5 µl der Probe (bakterielle DNA) hinzupipettiert, sodass sich daraus letztendlich ein Volumen von 50 µl ergab. Das PCR-Tube wurde ebenfalls für 20 Sekunden gevortext, für 20 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert und in den Thermocycler (Peltier Thermal Cycler; MJ Research, St. Bruno, Kanada) gegeben. Nachdem das richtige Programm ausgewählt wurde, konnte der Lauf nun gestartet werden. Die Programmierung des Thermocyclers mit den entsprechenden Temperaturzyklen kann in Anhang 5 entnommen werden. Beachtet wurde, dass bei jedem Lauf eine Negativkontrolle inkludiert wurde. Hierbei wurden anstelle von 5 µl Probenvolumen 5 µl H₂O-bidest zum „Master Mix“ pipettiert. Nach Beendigung der PCR wurde das Reaktionsgemisch bis zur Durchführung der reversen Hybridisierung bei einer Temperatur von 4 °C gelagert.

2.5.3 PariDent ELISA

Die im Reaktionsgemisch enthaltenen spezifischen Amplifikate der einzelnen Bakterienspezies wurden nun mittels ELISA-Prinzip detektiert. Das Testprinzip basiert zunächst auf der Hybridisierung der Amplifikate aus den PAF- bzw. den PMT-PCRs mit einzelsträngigen, spezifischen Oligonukleotidsonden, die auf der Polystyroloberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert sind. Diese sogenannten Hybridisierungsmodule der Mikrotiterplatten werden in Abbildung 19 dargestellt.

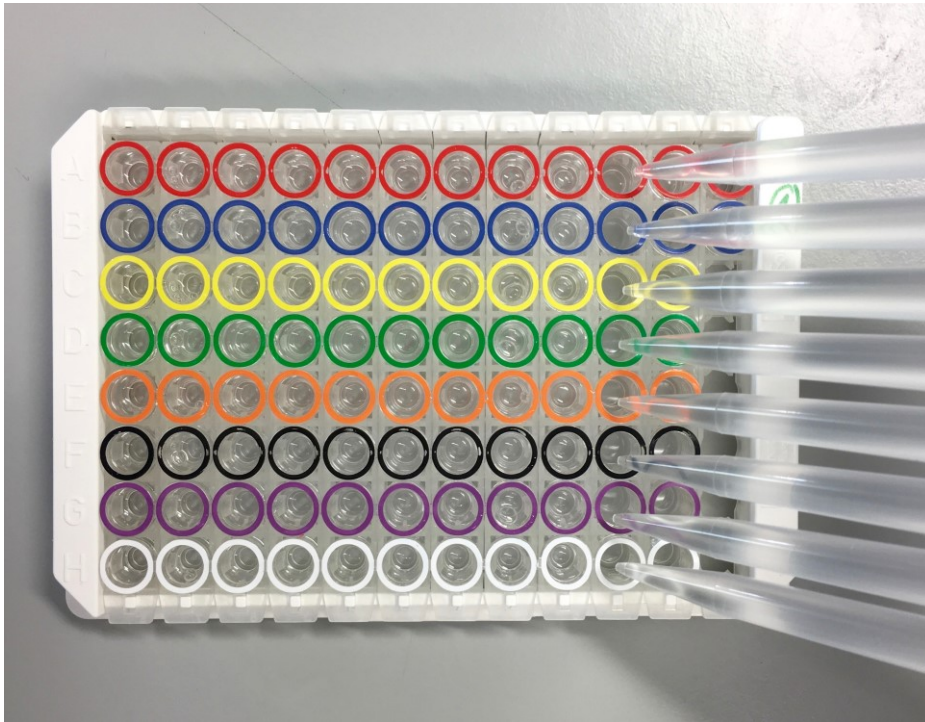


Abbildung 19: PariDent Hybridisierungsmodule

Jede Kavitätenfarbe weist eine andere Spezifität für eine bestimmte Bakterienspezies auf. So stellt die Farbe Rot das Hybridisierungsmodul für *A. actinomycetemcomitans*, und Blau das Modul für *P. gingivalis* dar. Die Farbe Gelb steht hingegen für *F. nucleatum*, Orange für *T. forsythia*, Schwarz für *P. micra*, Violett für *T. denticola* und Grün für *P. intermedia*. Die weißen Kavitäten beziehen sich auf die interne Kontrolle, die zur Ermittlung des Reagenzienhintergrundsignals verwendet wird.

Die Amplifikate werden zu Beginn hitzedenaturiert und zu den spezifischen Sonden gegeben, wobei mithilfe eines Hybridisierungspuffers eine Hybridisierung komplementärer Sequenzen stattfindet. Im Anschluss daran werden mehrere stringente Waschschrte durchgeführt und ein Peroxidase (POD)-Konjugat

hinzupipettiert. Das POD-Konjugat bindet hochspezifisch an eine Markierung des PCR-Produktes, sofern dieses an die spezifische Oligonukleotidsonde der Mikrotiterplatte gebunden ist. Nach erneuten Waschschritten wird schließlich Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung zugesetzt. Diese wird durch das POD-Konjugat umgesetzt und erzeugt eine blaue Farbe. Zum Schluss wird die Reaktion durch Zugabe einer Stopplösung beendet, wobei ein Farbumschlag nach Gelb induziert wird. Die Extinktionen der einzelnen Kavitäten können nun in einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen werden.

2.5.3.1 Durchführung der reversen Hybridisierung

Die Stringente Waschlösung wurde zu Beginn auf 50 °C vorgewärmt und der Hybridisierungspuffer und das Konjugat wurden (unverdünnt) auf Eis gelegt. Die Reaktionsgemische der PAF- und PMT-PCRs wurden anschließend in einer Mikrotiterplatte für 10 min bei einer Temperatur von 95 °C im Thermocycler denaturiert. In eine Pipettierplatte (MAGNA Pure LC Processing Cartridges; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wurden jeweils 300 µl des kalten Hybridisierungspuffers vorgelegt und 50 µl des PCR-Produktes hinzugegeben. Nachdem gut gemischt wurde, wurden davon jeweils 50 µl in die 8 farblich unterschiedlich kodierten Kavitäten pipettiert. In Abbildung 19 entspricht somit jede senkrechte Reihe auf der Mikrotiterplatte einer Patientenprobe. Die Platte wurde sodann 30 min bei einer Temperatur von 50 °C abgedeckt inkubiert.

Die im Folgenden angegebenen Mengenangaben beziehen sich jeweils auf die Bearbeitung einer einzelnen Mikrotiterplattenkavität. Die Kavitäten wurden vollständig geleert und mit je 200 µl der vorgewärmten Stringenten Waschlösung 3 mal kurz gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde die Platte mehrmals auf einem Papiertuch ausgeschlagen, um alle Flüssigkeitsreste aus den Kavitäten zu entfernen.

Nun wurde der Waschpuffer hergestellt, indem das im PariDent-Testkit enthaltene Konzentrat in einem Verhältnis von 1:20 mit H₂O-bidest verdünnt wurde. Die Kavitäten wurden mit je 200 µl Waschpuffer erneut 3 mal gewaschen.

Schließlich erfolgte die Herstellung des POD-Konjugats. Das konzentrierte Konjugat wurde mit dem zuvor verdünnten Waschpuffer in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt und gut gemischt. Davon wurden dann 100 µl pro Kavität

zupipettiert und die Mikrotiterplatte für 30 min bei Raumtemperatur abgedeckt inkubiert.

Die Kavitäten wurden dann wieder geleert und mit je 200 μ l Waschpuffer nochmals 3 mal sorgfältig gewaschen.

Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von 100 μ l TMB-Substratlösung pro Kavität. Die Mikrotiterplatte wurde daraufhin 30 min bei 37 °C ein weiteres Mal inkubiert. Zu guter Letzt wurden in jede Kavität 100 μ l Stopplösung pipettiert, um die Reaktion zu beenden. Der zuvor beschriebene Farbumschlag von Blau nach Gelb konnte nun beobachtet werden (Abbildungen 20 und 21).

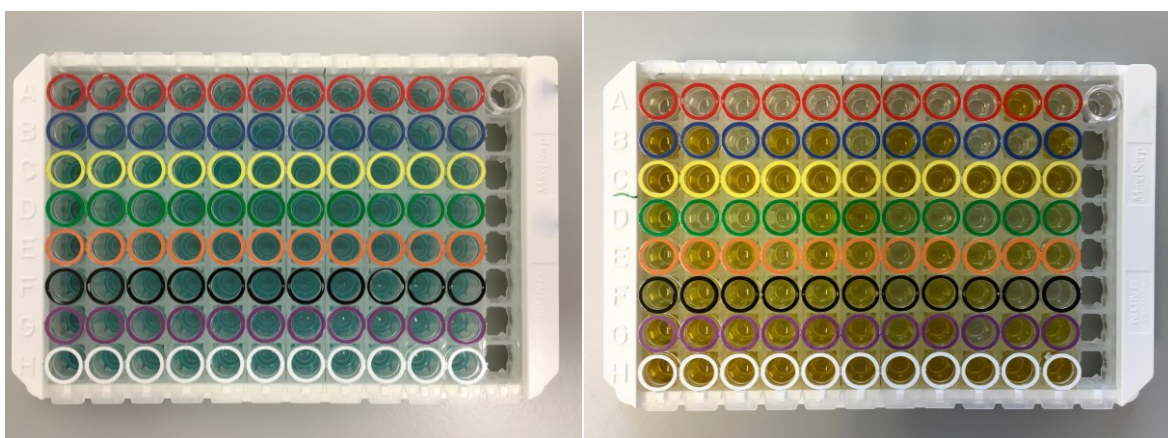


Abbildung 20 und 21: Farbumschlag in den Mikrotiterplattenkavitäten

Für jede Patientenprobe wurde eine interne Kontrolle (Reagenzienkontrolle) in den weißen Kavitäten mitgeführt. Hierbei wurde das Produkt der PMT-PCR wie oben beschrieben im Thermocycler zunächst denaturiert, mit Hybridisierungspuffer verdünnt und 50 μ l in die weiße Kavität pipettiert. Die interne Kontrolle wurde anschließend in gleicher Weise wie die Proben behandelt. Zusätzlich wurde bei jedem Testansatz die Negativkontrolle der PAF- und PMT-PCR mitgeführt. Diese wurde ebenfalls wie die Proben 10 min bei einer Temperatur von 95 °C denaturiert und mit Hybridisierungspuffer verdünnt. 50 μ l dieser Verdünnung wurden jeweils in die für die jeweilige PCR dazugehörigen farblich kodierten Kavitäten pipettiert und wie die Proben weiterbehandelt. Der Blindwert (Blank) für die später erfolgende Auswertung der gemessenen Extinktionen ergab sich durch die anfängliche Zugabe von 50 μ l reinen Hybridisierungspuffers in eine einzige farblose Mikrotiterplattenkavität (in Abbildung 20 und 21 jeweils rechts oben). Der Blank wurde daraufhin gleichfalls wie die Proben behandelt.

Die Extinktionen der Kavitäten wurden unmittelbar nach dem Abstoppen der Reaktion in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Varioskan Mikrotiterplatten-Reader; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzlänge von 620 nm gemessen. Der Nullabgleich erfolgte gegen Luft.

2.5.3.2 Auswertung der gemessenen Extinktionen

Die Auswertung der Extinktionen der einzelnen Kavitäten und somit die Identifikation der 7 womöglich vorhandenen Parodontopathogene in der Patientenprobe erfolgte gemäß der Kriterien der Gebrauchsinformation des PariDent-Testkits. Der Test war demnach auswertbar, sofern die Extinktion der internen Kontrollen $\geq 0,500$ und die Extinktion der Negativkontrolle $\leq 0,150$ betrug.

Je nach gemessenem Signal konnte dann das Vorhandensein einer Bakterienspezies entweder völlig ausgeschlossen werden oder eine Identifikation durch die Bezeichnung „+“, „++“ bzw. „+++“ semiquantitativ beschrieben werden. Dabei spiegelt die Kennzeichnung „+“ nur sehr geringe Mengen des jeweiligen Erregers in der Patientenprobe wider, wohingegen „+++“ eine sehr hohe Bakterienlast darstellt.

	A.a (rot)	P.g. (blau)	F.n. (gelb)	P.i. (grün)	T.f. (orange)	P.m. (schwarz)	T.d. (violett)
+	> 0,300	> 0,300	> 0,300	> 0,2	> 0,2	> 0,15	> 0,2
++	> 1,0	> 1,0	> 1,5	> 0,4	> 0,4	> 0,3	> 0,5
+++	> 2,0	> 2,0	> 2,5	> 0,6	> 0,6	> 0,5	> 1,0

Tabelle 3: Auswertekriterien der Extinktionen

In Tabelle 3 werden die Auswertekriterien der Extinktionen der einzelnen Kavitätenfarben verdeutlicht. Diese Extinktionen ergaben sich durch Berechnung mittels folgender Formel:

$$\text{Extinktion}_{\text{Kavität}} = (\text{Extinktion}_{450\text{nm}} - \text{Blank}_{450\text{nm}}) - (\text{Extinktion}_{620\text{nm}} - \text{Blank}_{620\text{nm}})$$

Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Software Excel (Microsoft Office Mac 2011 Home & Student; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

2.6 Statistische Auswertung

Die Darstellung der erhobenen klinischen Daten, wie beispielsweise Zahnverluste aufgrund von Parodontitis oder die Anzahl behandlungsbedürftiger Stellen, erfolgte deskriptiv. Im Folgenden wurde das Auftreten der einzelnen identifizierten Parodontopathogene in allen Patientenproben berechnet und zudem die Ergebnisse zwischen MALDI-TOF MS und PariDent miteinander verglichen. Die Berechnung erfolgte ebenfalls mit der Software Excel. Zur Betrachtung der Zusammenhänge zwischen einzelnen klinischen Daten und den identifizierten Parodontopathogenen wurde eine Korrelation nach Spearman durchgeführt (Spearman-Rank-Korrelationskoeffizient r , signifikant wenn $p < 0,05$ und hoch signifikant wenn $p < 0,01$). Dieser Test zeigt bei Signifikanz entweder eine positive oder eine negative Korrelation der untersuchten Datenmengen. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe einer Statistik-Software (SPSS, Version 24, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3 Ergebnisse

Um einen Überblick aller Ergebnisse zu ermöglichen, werden diese im Folgenden zunächst kurz zusammengefasst.

Als Erstes erfolgt eine Darstellung der deskriptiven Ergebnisse der klinischen Untersuchung, welche sich aus der Auswertung der Anamnese- und Befundbögen ergaben. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Thematisierung der behandlungsbedürftigen Zähne bzw. der behandlungsbedürftigen Stellen der Patienten im Rahmen ihres jeweiligen Parodontalbefundes gelegt.

Im mikrobiologischen Teil werden zunächst die Ergebnisse der MALDI-TOF MS-basierten Speziesbestimmung aufgezeigt. So wird deutlich, wie oft die einzelnen identifizierten Mikroorganismen in den Patientenproben nachgewiesen wurden und welche Bakteriengattungen am stärksten vertreten waren. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse des PariDent-Testkits erläutert und ebenfalls aufgezeigt, wie oft die 7 nachweisbaren Parodontopathogene in den Proben identifiziert wurden.

Als Nächstes erfolgt ein Vergleich der Ergebnisse zwischen den beiden Testverfahren und es wird prozentual dargestellt, wie oft die Ergebnisse der beiden Methoden in Bezug auf einzelne Keime übereinstimmten. Darüberhinaus werden Korrelationen zwischen dem klinischen Parameter Zahnverlust und dem jeweils identifizierten Keimspektrum der Patienten aufgezeigt.

3.1 Deskriptive Ergebnisse der klinischen Untersuchung

Das Patientenkollektiv dieser Studie umfasste 39 Probanden, unter denen 14 weiblichen und 25 männlichen Geschlechts waren. Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei $62,9 \pm 13,2$ Jahren. Der Median des Patientenalters belief sich auf 65,0 Jahre.

Mithilfe eines standardisierten Anamnesebogens galt es zunächst für das Krankheitsbild der Parodontitis relevante Faktoren zu erfragen. Nachfolgend wurde ein zahnärztlicher Befund und ein genauer Parodontalbefund erhoben, wobei eigens auf die parodontale Situation der Patienten im späteren Abschnitt eingegangen wird.

3.1.1 Familiäre Vorbelastung

Um eine mögliche familiäre Vorbelastung bestimmen zu können, galt es im Rahmen der Familienanamnese nach dem Auftreten von Parodontalerkrankungen bei Familienmitgliedern (ja / nein) zu fragen. Die Ergebnisse werden in Abbildung 22 dargestellt.

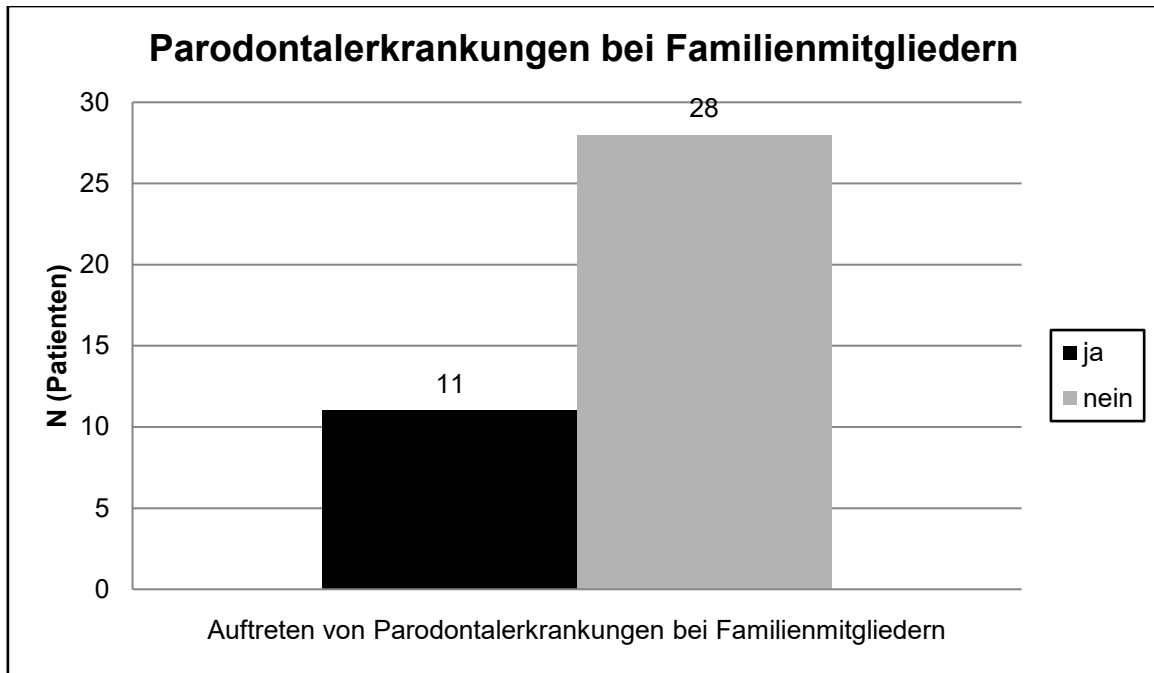


Abbildung 22: Parodontalerkrankungen bei Familienmitgliedern

3.1.2 Medikamentenanamnese

Zudem wurde der mögliche Einfluss von systemisch wirksamen Medikamenten auf die Manifestation einer Parodontitis untersucht. Demnach wurden alle Probanden gefragt, ob sie aktuell Medikamente (ja / nein) einnehmen und falls ja, welche Präparate und seit wann. In Abbildung 23 werden die Ergebnisse dargelegt. So gaben insgesamt 24 Patienten an, dass sie aktuell einer medikamentösen Behandlung bedürfen, was wiederum 61,5% des gesamten Patientenkollektivs entspricht.

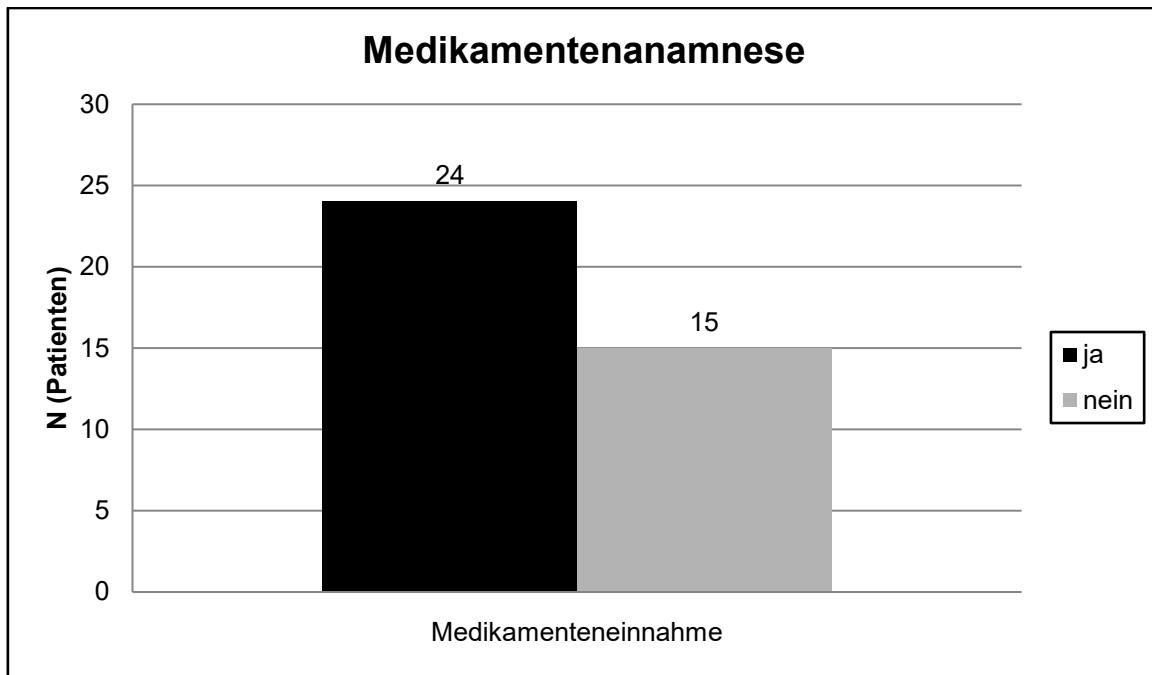


Abbildung 23: Einnahme von Medikamenten

Interessant erschien, dass die meisten Patienten mit positiver Medikamentenanamnese Arzneistoffe zur Behandlung des Bluthochdrucks, wie beispielsweise Amlodipin, Ramipril oder Bisoprolol, einnahmen. Ebenfalls häufig angegeben wurde der Wirkstoff Acetylsalicylsäure (ASS 100) und die Einnahme von Psychopharmaka. Abbildung 24 verdeutlicht nochmals die Verteilung der am häufigsten verordneten Arzneimittel.

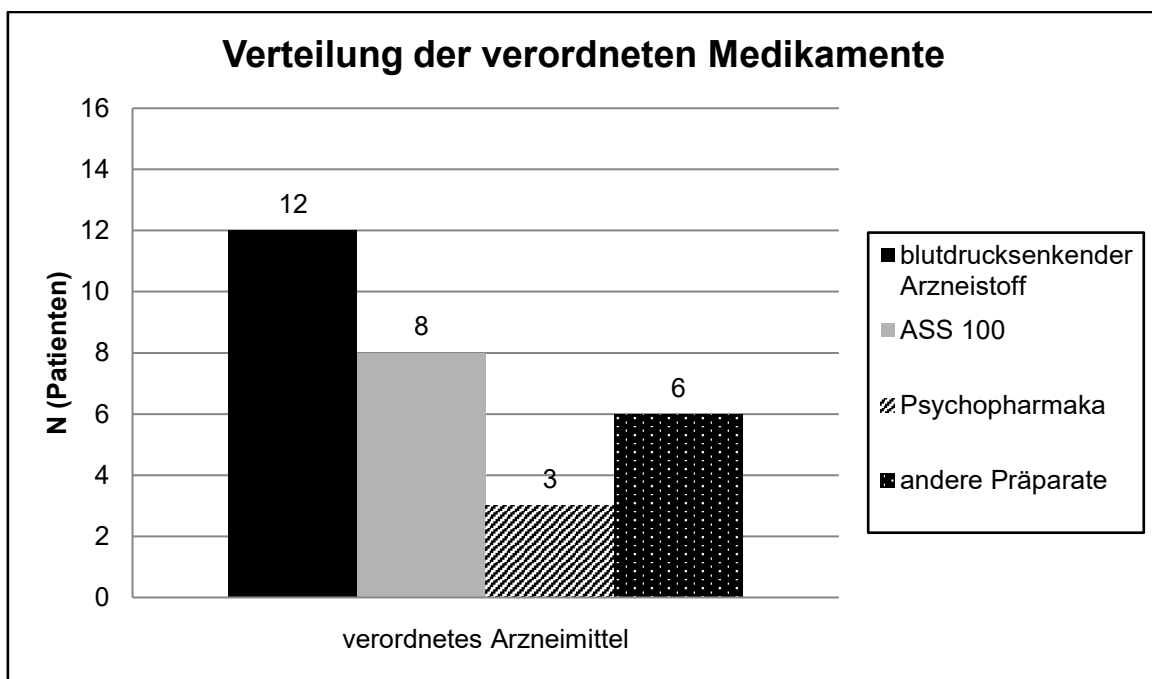


Abbildung 24: Verteilung der verordneten Medikamente

3.1.3 Manifestation von systemischen Erkrankungen

Um die Auswirkung von systemischen Erkrankungen auf die Gesundheit des Parodontiums beurteilen zu können, wurde des Weiteren nach relevanten Allgemeinerkrankungen gefragt. So wurde unter diesem Aspekt bei allen 39 Probanden notiert, ob Diabetes mellitus, Osteoporose, Atherosklerose oder auch eine Bluterkrankung (ja / nein) vorlag. Es gaben lediglich 3 Patienten an, gegenwärtig an einer Bluterkrankung zu leiden. Zudem lag bei 2 Patienten Atherosklerose und bei 1 Patient Diabetes mellitus vor. Veranschaulicht werden diese Ergebnisse in Abbildung 25.

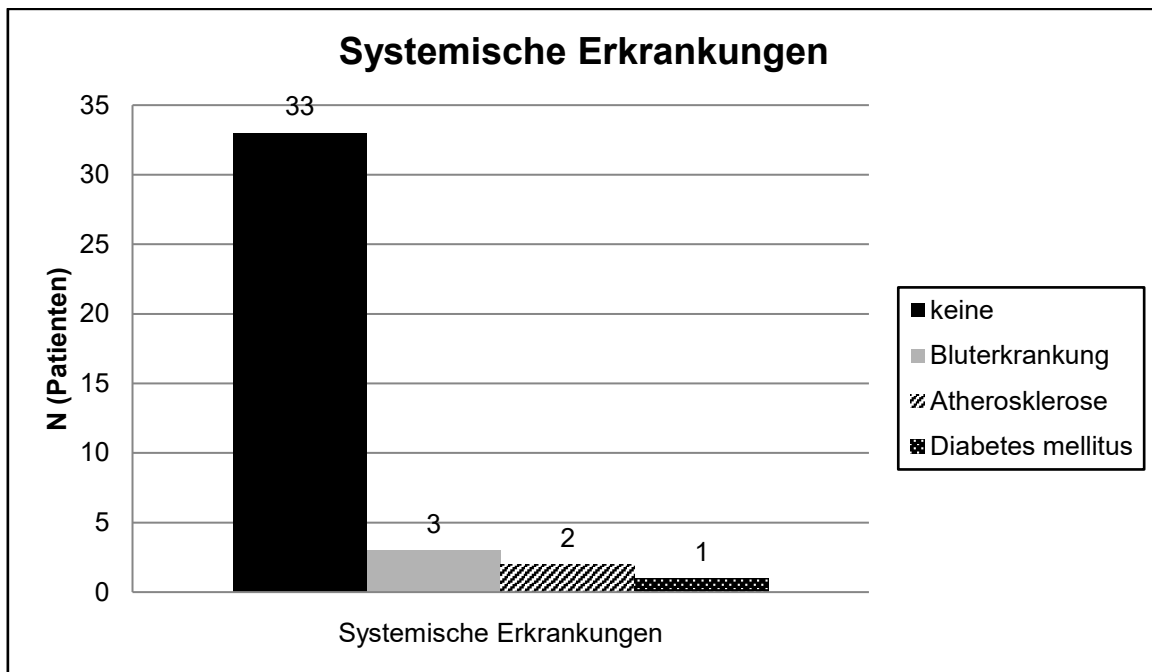


Abbildung 25: Manifestation von systemischen Erkrankungen

3.1.4 Tabakkonsum

Unter den 39 Patienten befanden sich insgesamt 17 Raucher, was 43,6% entspricht. Die Einteilung der Patienten mit aktuellem oder auch vorangegangenen Tabakkonsum erfolgte nach Packungsjahren (pack years, py) (≤ 10 pack years / > 10 pack years). Eine Übersicht des Rauchverhaltens aller Probanden kann in Abbildung 26 entnommen werden.

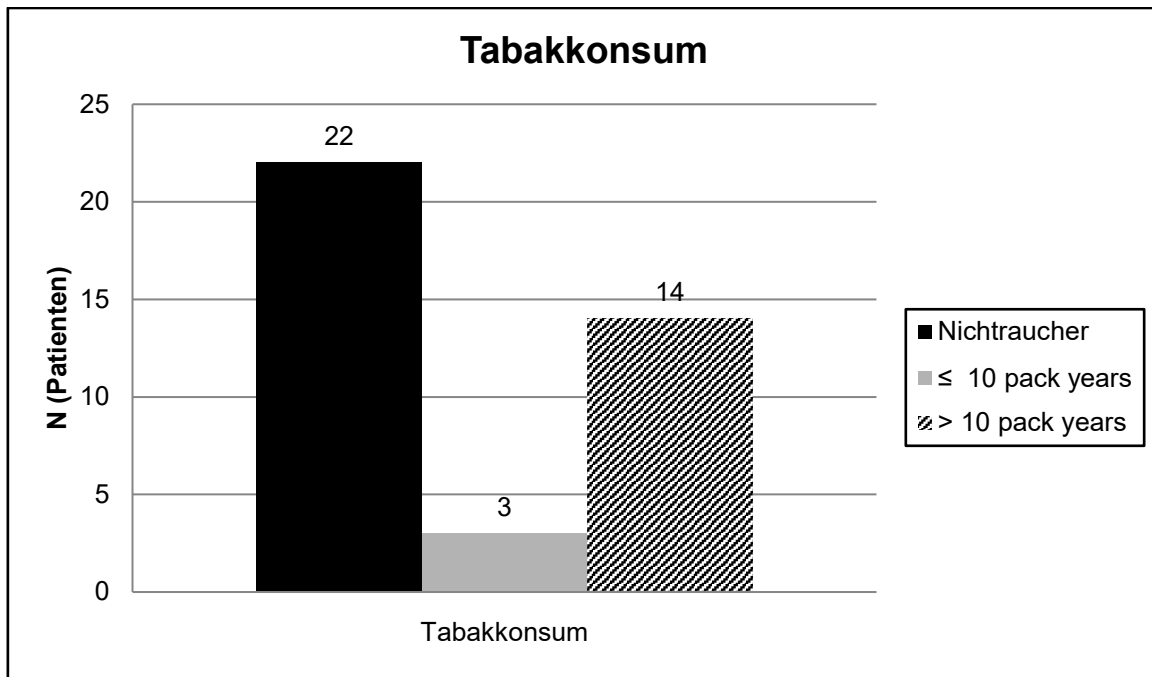


Abbildung 26: Einteilung der Patienten nach Rauchverhalten

3.1.5 Vergangene parodontale Behandlungsmaßnahmen

Um die vergangene Zahnarzterfahrung der Probanden einzuordnen, wurde jeder Patient gefragt, ob in der Vergangenheit eine Parodontitisbehandlung stattgefunden hatte (ja / nein). Falls ja, wurde zudem gefragt, welche Behandlungsmaßnahmen ergriffen wurden und zu welchem Zeitpunkt diese durchgeführt wurden. Demnach gaben 25 Patienten an, bereits eine parodontale Behandlungsmaßnahme erfahren zu haben, was 64,1% aller 39 Patienten entspricht. Die Einteilung der Probanden mit früherer Parodontitisbehandlung erfolgte nach dem zeitlichen Abstand der letzten Behandlungsmaßnahme (≤ 1 Jahr / > 1 Jahr), was in Abbildung 27 ersichtlich ist.

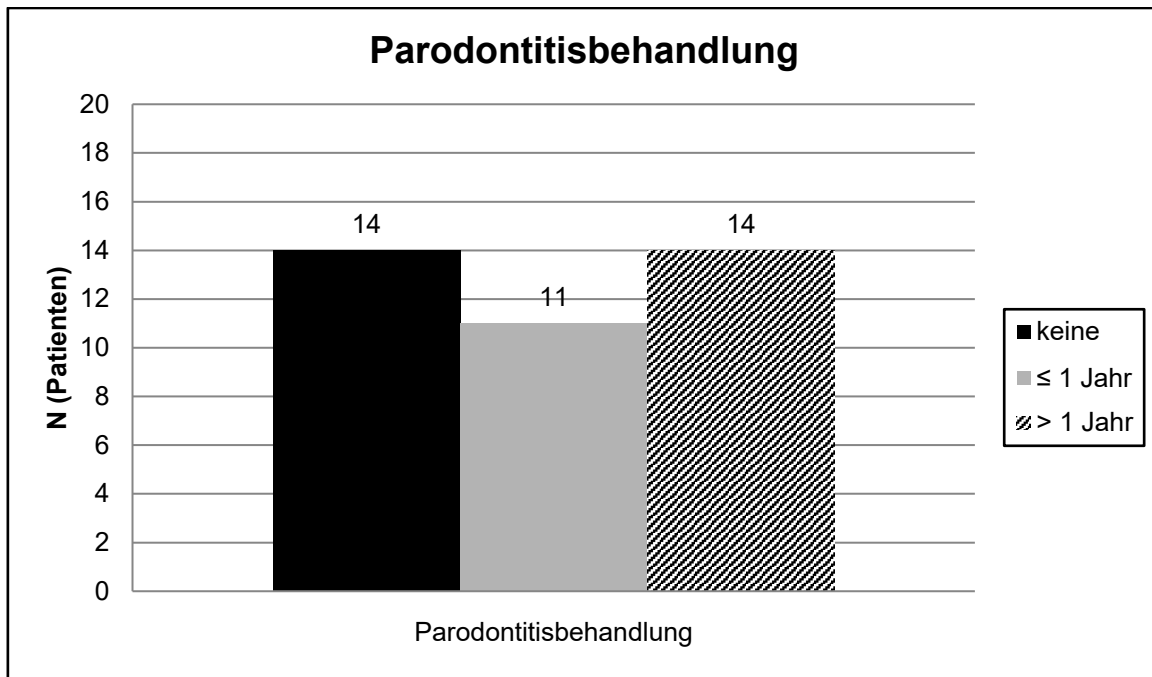


Abbildung 27: Frühere Parodontalbehandlung

3.1.6 Auftreten von Symptomen und Zahnverlusten

Außerdem wurden alle Probanden nach dem Auftreten von typischen Symptomen einer Parodontitis, wie Zahnfleischbluten und Zahnlockerungen, gefragt (keine / Blutung / Lockerung / Blutung und Lockerung; siehe Abbildung 28). Es nahmen insgesamt 25 Patienten mindestens eines der genannten Symptome zum Zeitpunkt der Befragung wahr, was ebenfalls einem Anteil von 64,1% entspricht.

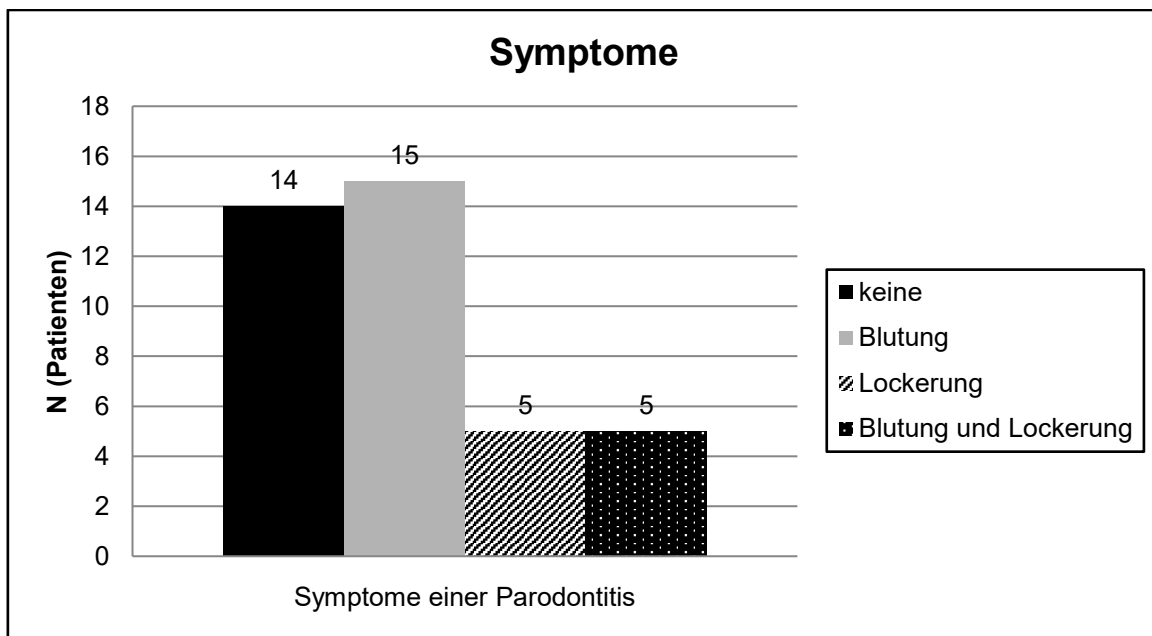


Abbildung 28: Manifestation von Symptomen einer Parodontitis

Es wurde zudem bei jedem Patienten notiert, ob in der Vergangenheit aus Gründen der Parodontitis ein Zahnverlust verzeichnet werden konnte (ja / nein; siehe Abbildung 29). Eine genauere Einteilung der Patienten, die einen Zahnverlust aufwiesen, erfolgte anhand der Anzahl der verlorengegangenen Zähne (≤ 3 / 4-7 / > 7), was durch Abbildung 30 veranschaulicht wird.

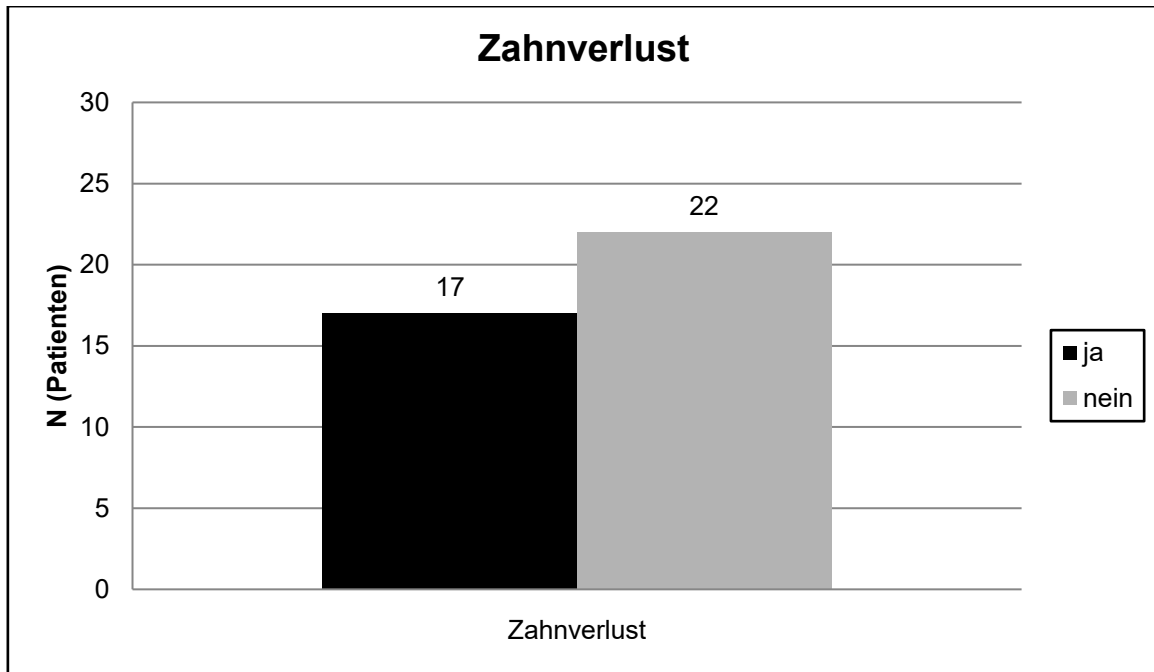


Abbildung 29: Zahnverlust durch Parodontitis

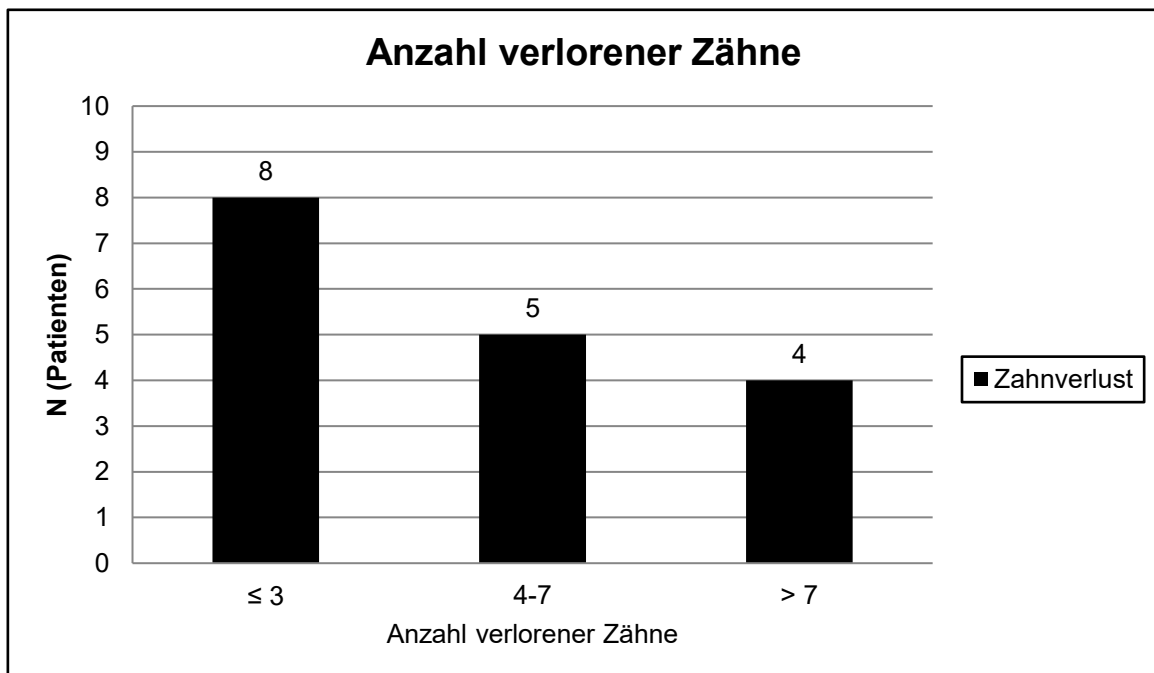


Abbildung 30: Anzahl verlorener Zähne durch Parodontitis

3.1.7 Aktueller parodontaler Zustand

Um einen Überblick über die aktuelle Parodontalsituation der Probanden zu gewährleisten, wurde zunächst bei allen Patienten im Rahmen eines ausführlichen Parodontalstatus neben den Rezessionen, den möglichen Furkationsbeteiligungen und Lockerungsgraden der Zähne, die genaue Anzahl der behandlungsbedürftigen Stellen ermittelt (Mombelli *et al.* 2017). Anschließend konnte die Zahl der behandlungsbedürftigen Zähne notiert werden, die durch die Präsenz von mindestens einer behandlungsbedürftigen Stelle gekennzeichnet waren. So wurden bei allen 39 Patienten insgesamt 885 Zähne mit insgesamt 5310 Stellen (bei bereits beschriebener 6-Punkt-Messung) untersucht.

3.1.7.1 Behandlungsbedürftige Stellen

Bei jedem Patienten lagen durchschnittlich $136,2 \pm 35,1$ Stellen vor. Dabei belief sich die Zahl der behandlungsbedürftigen Stellen auf durchschnittlich $26,8 \pm 16,9$. In Abbildung 31 wird die Einteilung der Patienten in Risikogruppen in Abhängigkeit von der Anzahl behandlungsbedürftiger Stellen veranschaulicht.

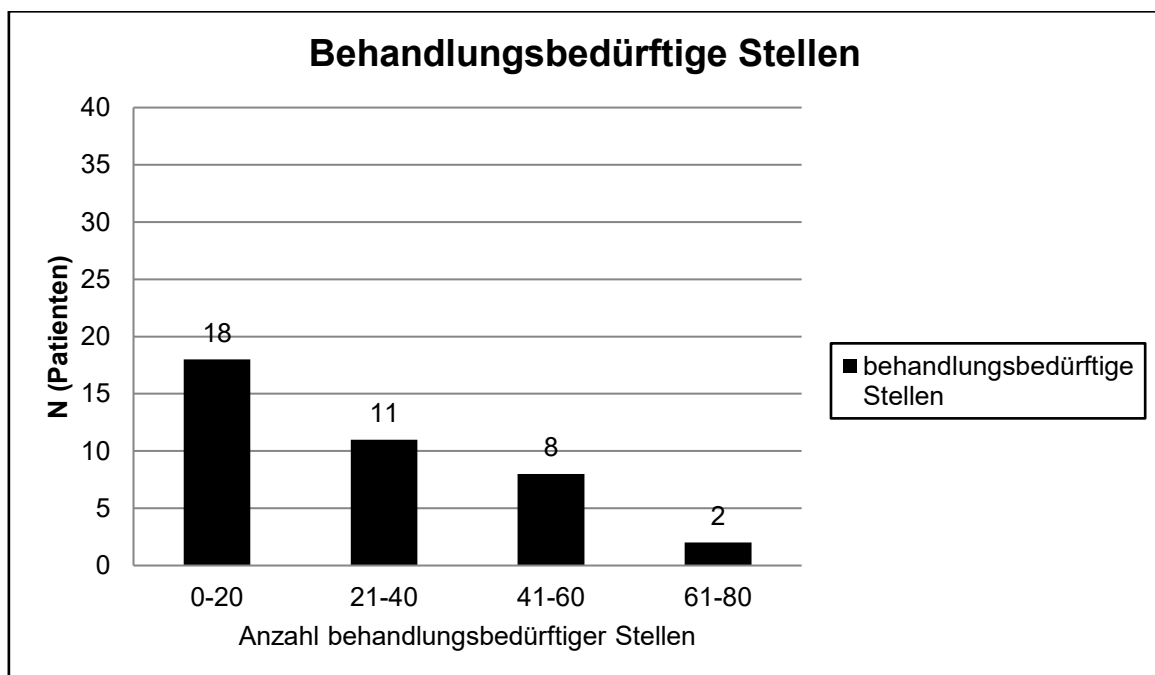


Abbildung 31: Verteilung der Anzahl behandlungsbedürftiger Stellen

3.1.7.2 Behandlungsbedürftige Zähne

Jeder Proband wies im zahnärztlichen Befund durchschnittlich $22,7 \pm 5,9$ Zähne auf. Davon waren im Durchschnitt $12,1 \pm 5,4$ Zähne behandlungsbedürftig. Die Verteilung der Anzahl der behandlungsbedürftigen Zähne innerhalb des Patientenkollektivs kann Abbildung 32 entnommen werden.

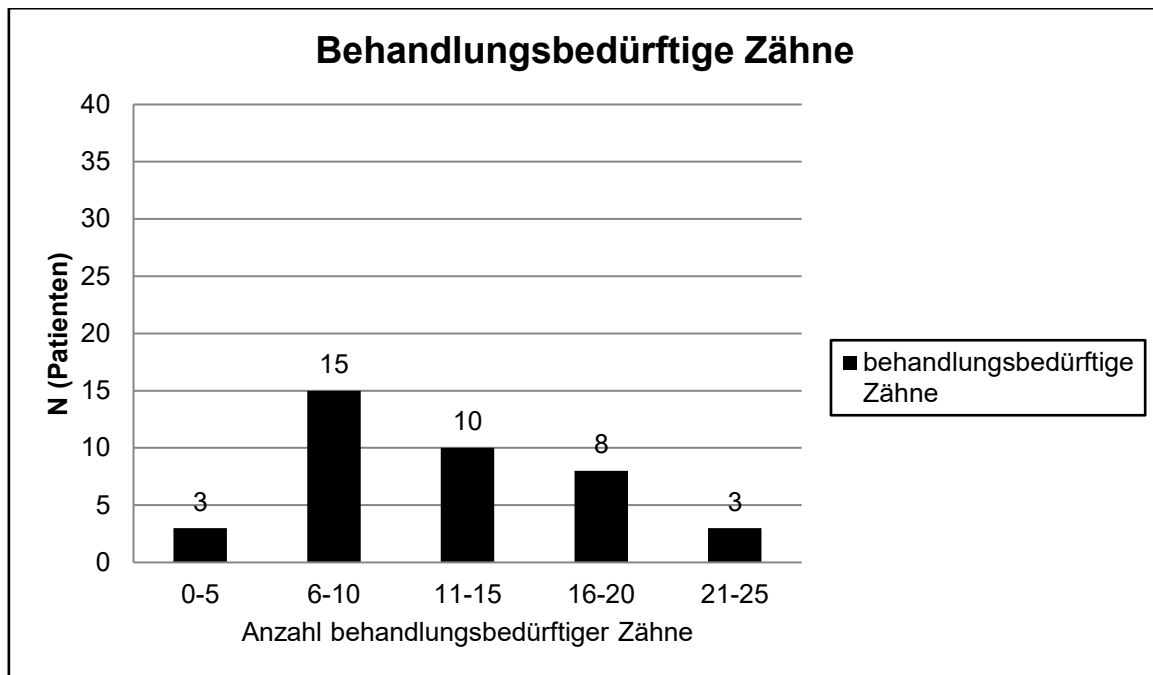


Abbildung 32: Verteilung der Anzahl behandlungsbedürftiger Zähne

Eine Übersicht über alle zuvor beschriebenen deskriptiven Ergebnisse der klinischen Untersuchung liefert Tabelle 4.

Parodontalerkrankungen bei Familienmitgliedern				
Codierung		Ja		Nein
N		11		28
Medikamenteneinnahme				
Codierung		Ja		Nein
N		24		15
Verordnete Medikamente				
Codierung	blutdrucksenk. Arzneistoff	ASS 100	Psychopharmaka	andere Präparate
N	12	8	3	6

Systemische Erkrankungen					
Codierung	keine	Diabetes	Osteoporose	Atherosklerose	Bluterkrankung
N	33	1	0	2	3
Tabakkonsum					
Codierung	Nichtraucher		≤ 10 pack years	> 10 pack years	
N	22		3	14	
Parodontitisbehandlung					
Codierung	keine		≤ 1 Jahr	> 1 Jahr	
N	14		11	14	
Symptome					
Codierung	keine	Blutung	Lockerung	Blutung und Lockerung	
N	14	15	5	5	
Zahnverlust durch Parodontitis					
Codierung	Ja			Nein	
N	17			22	
Anzahl verlorener Zähne					
Codierung	≤ 3		4 - 7	> 7	
N	8		5	4	
Behandlungsbedürftige Stellen					
Codierung	0-20	21-40	41-60	61-80	
N	18	11	8	2	
Behandlungsbedürftige Zähne					
Codierung	0-5	6-10	11-15	16-20	21-25
N	3	15	10	8	3

Tabelle 4: Zusammenfassung der deskriptiven klinischen Parameter

3.2 Mikrobiologische Auswertung

Der mikrobiologische Teil der Auswertung bezieht sich sowohl auf die Resultate der MALDI-TOF MS-basierten Speziesbestimmung als auch auf die Ergebnisse der Erregeridentifikation mithilfe von PariDent. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Angabe, wie oft die identifizierten Spezies in den jeweiligen Patientenproben nachgewiesen werden konnten bzw. inwieweit sich die Ergebnisse zwischen den beiden Diagnostikmethoden decken.

3.2.1 MALDI-TOF MS-basierte Speziesbestimmung

In den 39 Patientenproben konnten mittels MALDI-TOF MS insgesamt 61 verschiedene Bakterienspezies identifiziert werden. Dabei wurden durchschnittlich $7,0 \pm 2,5$ unterschiedliche Mikroorganismen pro Patientenprobe nachgewiesen.

3.2.1.1 Bestimmung der Keimzahlen

Die in Bezug auf alle Patienten am häufigsten nachgewiesene Bakterienspezies stellt *Streptococcus oralis* dar, die insgesamt bei 24 Probanden detektiert werden konnte. Ebenfalls vielfach identifiziert wurde die Spezies *Parvimonas micra*, die in 20 Patientenproben auftrat. Ferner konnten sowohl *A. odontolyticus* als auch *F. nucleatum* in der subgingivalen Plaque von 19 Patienten nachgewiesen werden. Alle Differenzierungsergebnisse der MALDI-TOF MS basierten Erregerdiagnostik und die Anzahl des Vorkommens der einzelnen Bakterienspezies in den Patientenproben sind aus Anhang 6 zu entnehmen. Eine detaillierte Darstellung darüber, welche Mikroorganismen gemeinsam bei den einzelnen Probanden identifiziert werden konnten liefert eine Excel Tabelle, die sich ebenfalls in Anhang 6 befindet. So wurden mittels MALDI-TOF MS bei allen 39 Patienten insgesamt 272 Identifikationsergebnisse mit einem score-value > 2 erzielt.

3.2.1.2 Unterteilung nach Gattungen

Insgesamt verteilten sich die einzelnen identifizierten Spezies auf 27 verschiedene Bakteriengattungen. Die meisten Vertreter konnten dabei die Gattungen *Streptococcus spp.* (12 unterschiedliche Spezies) und *Prevotella spp.* (10 unterschiedliche Spezies) verzeichnen. Durch die Abbildungen 33 und 34 wird veranschaulicht, wie häufig die nachgewiesenen Spezies der Gattungen *Streptococcus spp.* und *Prevotella spp.* in den Patientenproben auftraten.

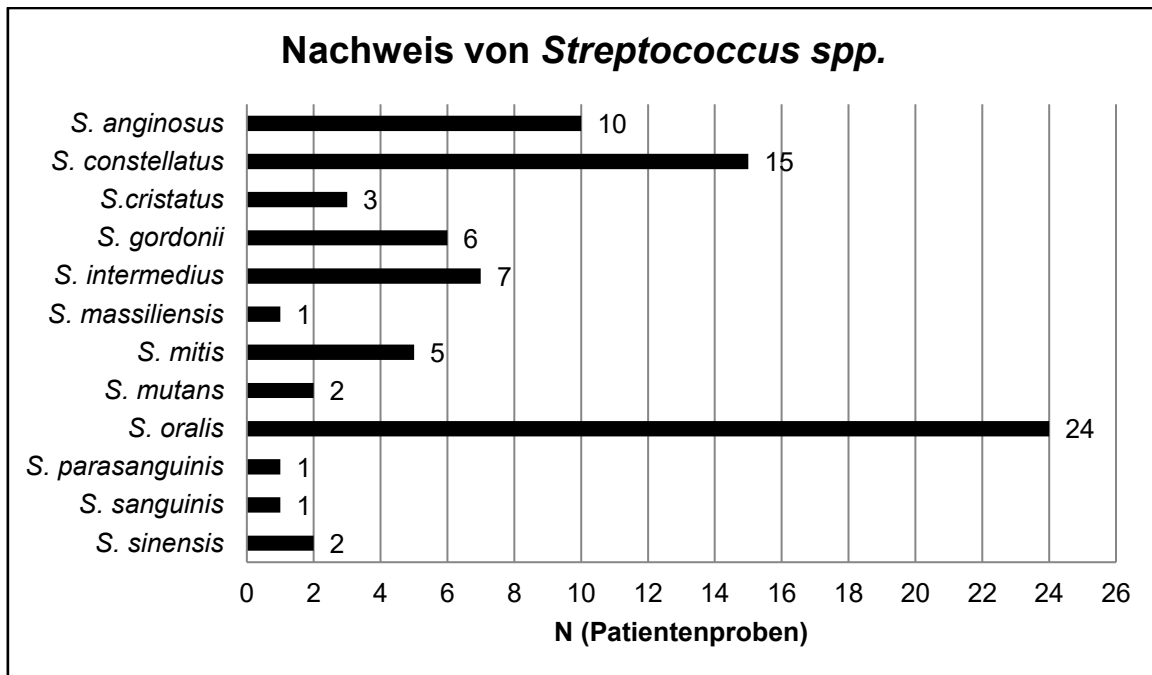


Abbildung 33: Auftreten der identifizierten Spezies der Gattung *Streptococcus* spp.

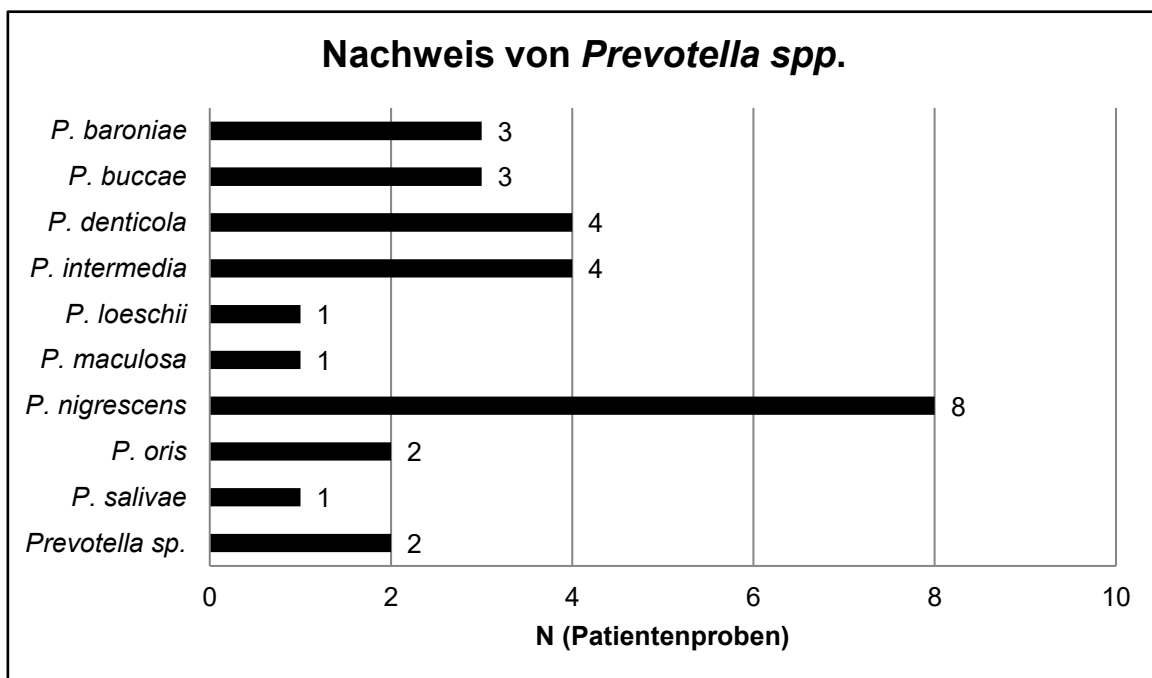


Abbildung 34: Auftreten der identifizierten Spezies der Gattung *Prevotella* spp.

Ausgeprägte Bakteriengattungen stellten des Weiteren *Actinomyces* spp. (4 verschiedene Spezies, siehe Abbildung 35), *Campylobacter* spp., *Capnocytophaga* spp. und *Fusobacterium* spp. (jeweils 3 unterschiedliche Bakterienspezies, siehe Abbildung 36, 37 und 38) dar.

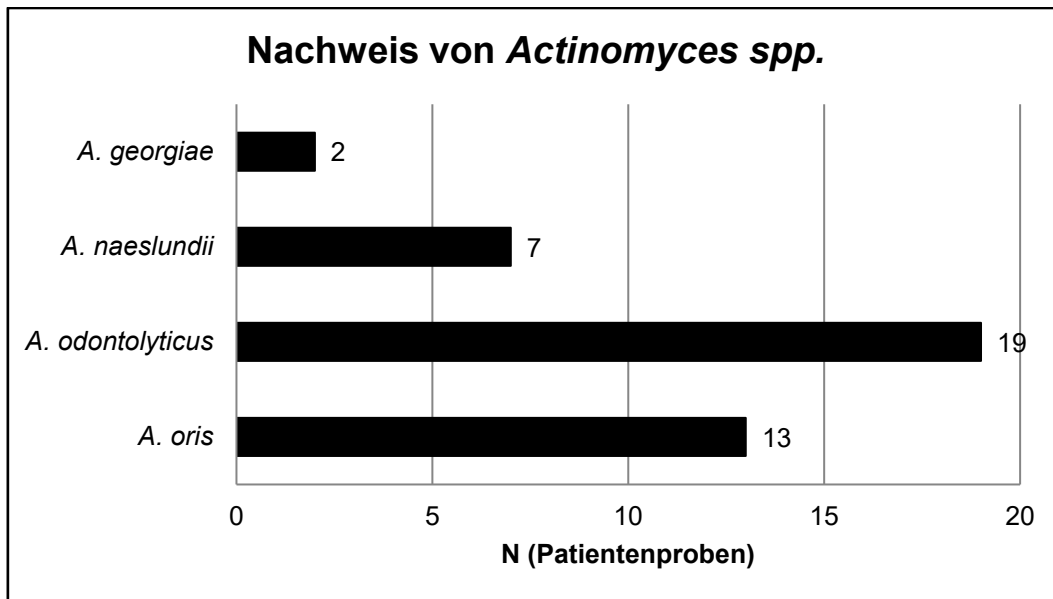


Abbildung 35: Auftreten von *Actinomyces* spp. in den Patientenproben

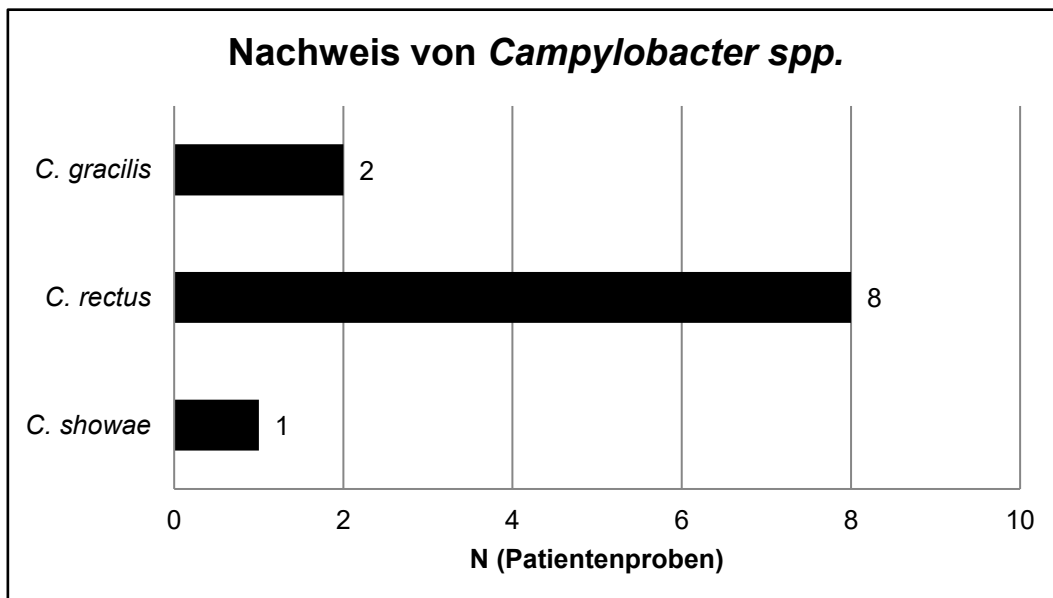


Abbildung 36: Auftreten von *Campylobacter* spp. in den Patientenproben

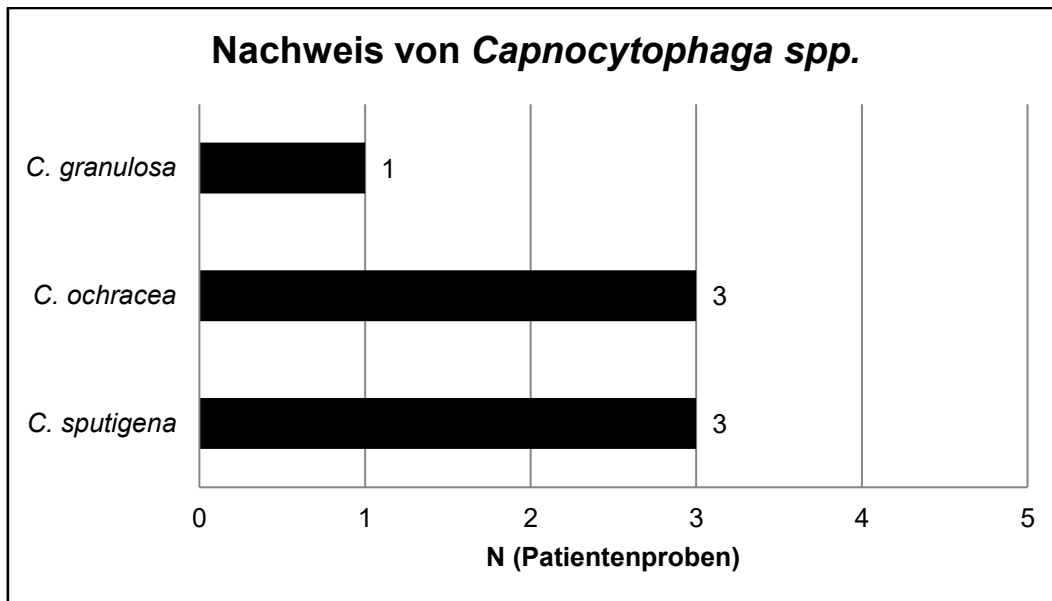


Abbildung 37: Auftreten von *Capnocytophaga* spp. in den Patientenproben

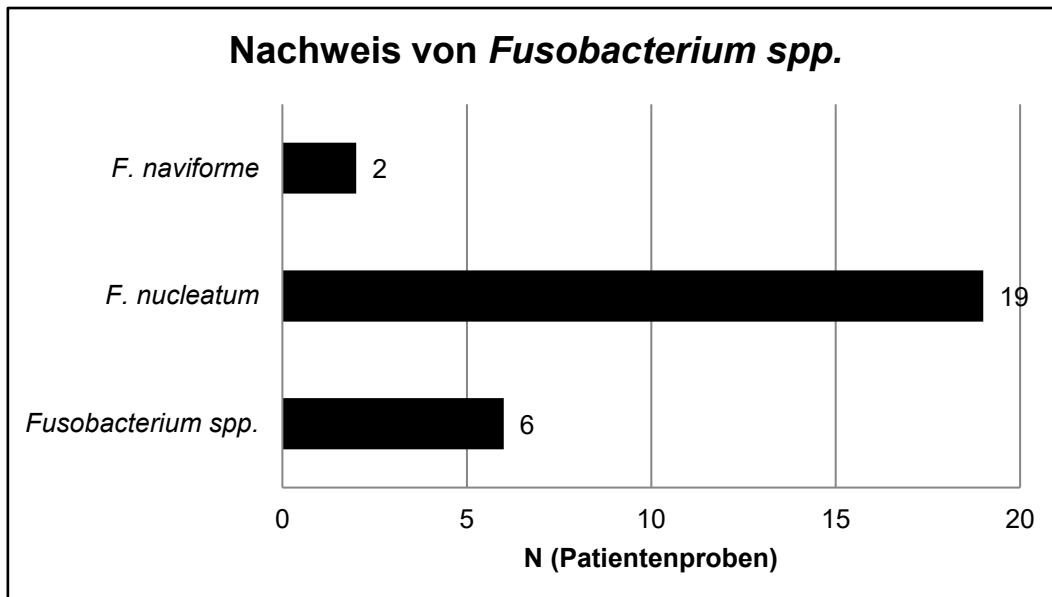


Abbildung 38: Auftreten von *Fusobacterium* spp. in den Patientenproben

Eine graphische Darstellung des Vorkommens einzelner Bakterienspezies bzw. von Bakteriengattungen mit maximal 2 identifizierten Spezies in den Patientenproben erfolgt durch Abbildung 39.

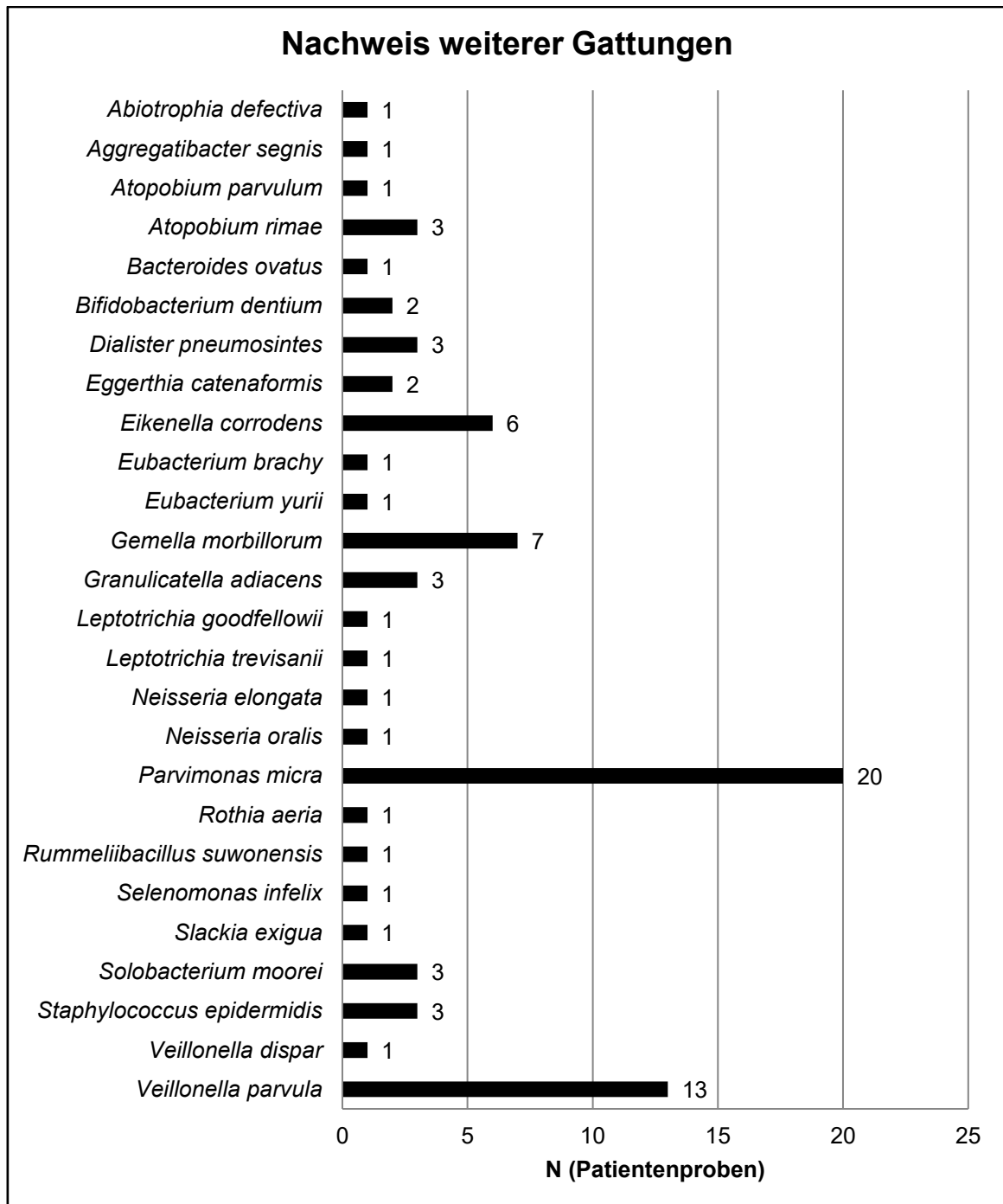


Abbildung 39: Verteilung kleinerer Bakteriengattungen bzw. einzelner Spezies in den Patientenproben

Bei Betrachtung relevanter parodontopathogener Keime wird augenscheinlich, dass diese bei der MALDI-TOF MS-Diagnostik insbesondere durch Vertreter von folgenden Gattungen nachgewiesen wurden: *Campylobacter* spp., *Capnocytophaga* spp., *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp. sowie *P. micra* als alleiniger Vertreter der Gattung *Peptostreptococcus* spp. Abbildung 40 fasst dabei

die identifizierten parodontopathogenen Erreger zusammen und veranschaulicht deren Verteilung in den Patientenproben.

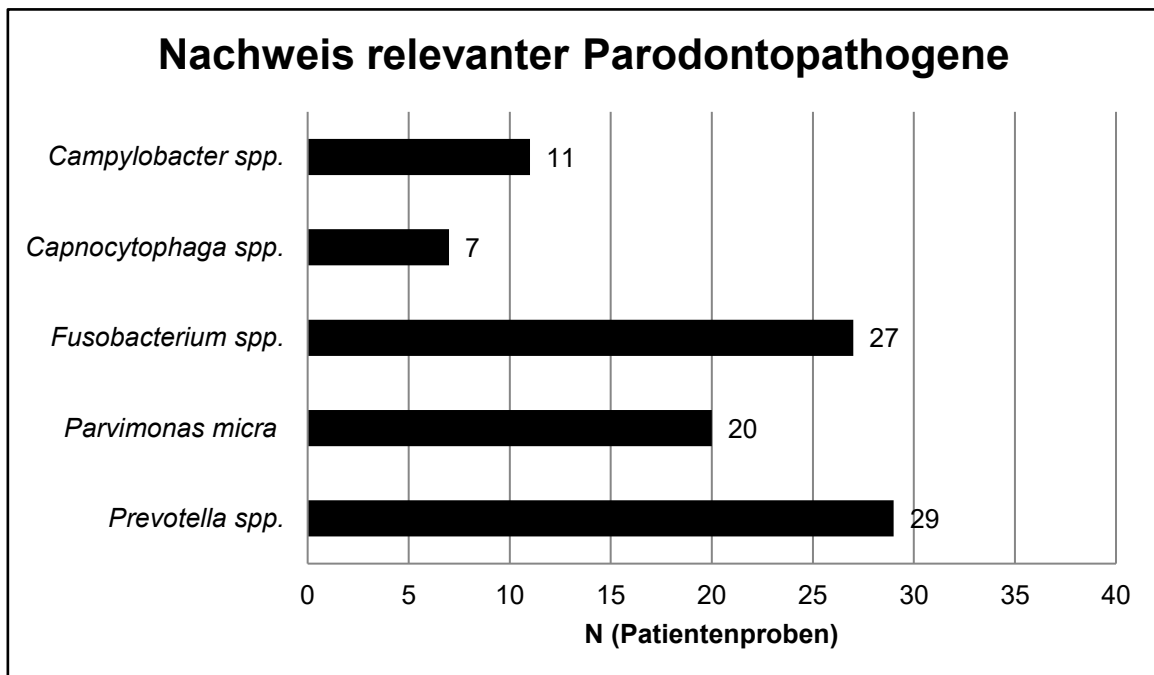


Abbildung 40: Identifikation parodontitisassoziierter Mikroorganismen

3.2.2 Keimbestimmung durch PariDent

Mithilfe von PariDent konnten die Patientenproben auf das Vorliegen von lediglich 7 verschiedenen Parodontopathogenen getestet werden. Dabei stehen in unserer Auswertung sowohl „+“, „++“ als auch „+++“ der PariDent Ergebnisse für das Vorhandensein und somit einer Identifikation des jeweiligen Mikroorganismus. Am häufigsten wurden mittels PariDent *F. nucleatum* und *T. forsythia* detektiert, die in fast allen Patientenproben nachgewiesen werden konnten. Die bekannten Markerkeime für schwere Krankheitsverläufe *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* wurden hingegen nur bei 6 bzw. 9 Patienten identifiziert. Eine genaue Übersicht dieser Ergebnisse liefert Abbildung 41. Aus einer weiteren Excel Tabelle in Anhang 6 können zudem die einzelnen Identifikationsergebnisse aller Patientenproben entnommen werden.

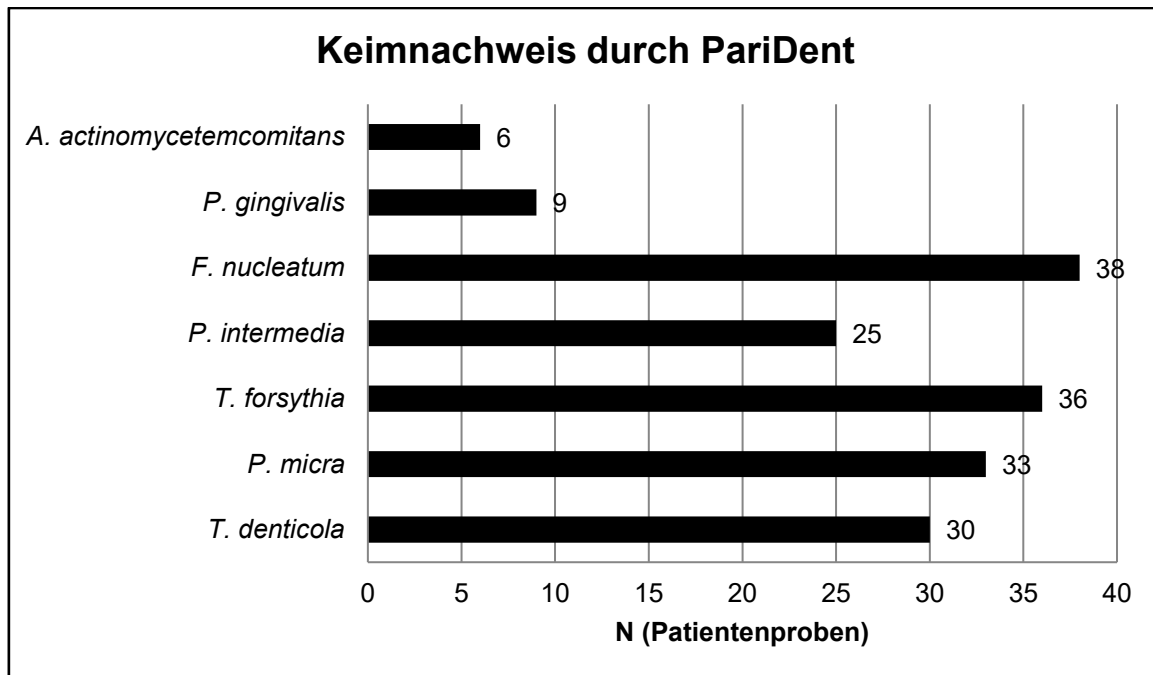


Abbildung 41: Erregeridentifikation durch PariDent

3.2.3 Übereinstimmung beider Diagnostikmethoden

Beim Vergleich der MALDI-TOF MS-basierten Speziesbestimmung mit den Ergebnissen des PariDent-Testkits wird deutlich, dass die 3 Mikroorganismen *F. nucleatum*, *P. intermedia* und *P. micra* mit beiden Methoden identifiziert werden konnten. Im Folgenden wird bei der Auswertung angenommen, dass das PariDent-Testsystem die 7 nachweisbaren Mikroorganismen nicht exakt auf Speziesebene identifiziert, sondern auch dann ein positives Ergebnis liefert, sobald ein Vertreter der jeweiligen Gattung in der Probe vorliegt. So wurden alle durch MALDI-TOF MS nachgewiesenen Spezies der Gattungen *Fusobacterium* spp. sowie *Prevotella* spp. und die Bakterienspezies *P. micra* mit PariDent verglichen und deren gemeinsames Auftreten in den Patientenproben analysiert.

Bezüglich *Fusobacterium* spp. wurden mit MALDI-TOF MS und PariDent in 21 Patientenproben übereinstimmende Ergebnisse erzielt, was wiederum einem Anteil von 53,8% in Bezug auf alle 39 Proben entspricht. Bei einem Patienten liefert PariDent ein negatives Ergebnis, obwohl *Fusobacterium* spp. durch MALDI-TOF MS in der Probe nachgewiesen wurde. Umgekehrt konnte mit PariDent bei 13 Patienten mit dem Ergebnis „+++“ eine sehr hohe Bakterienlast in der subgingivalen Plaque nachgewiesen werden. Die massenspektrometrische Analyse hingegen konnte in diesen Proben keinen Mikroorganismus der Gattung

Fusobacterium spp. identifizieren. Des Weiteren wurde mit PariDent in 3 Fällen *F. nucleatum* mit einer Erregerlast „++“ und bei einem Patienten *F. nucleatum* mit „+“ identifiziert, obwohl MALDI-TOF MS keine ribosomalen Proteine der Gattung detektieren konnte. Veranschaulicht werden diese Ergebnisse durch Abbildung 42.

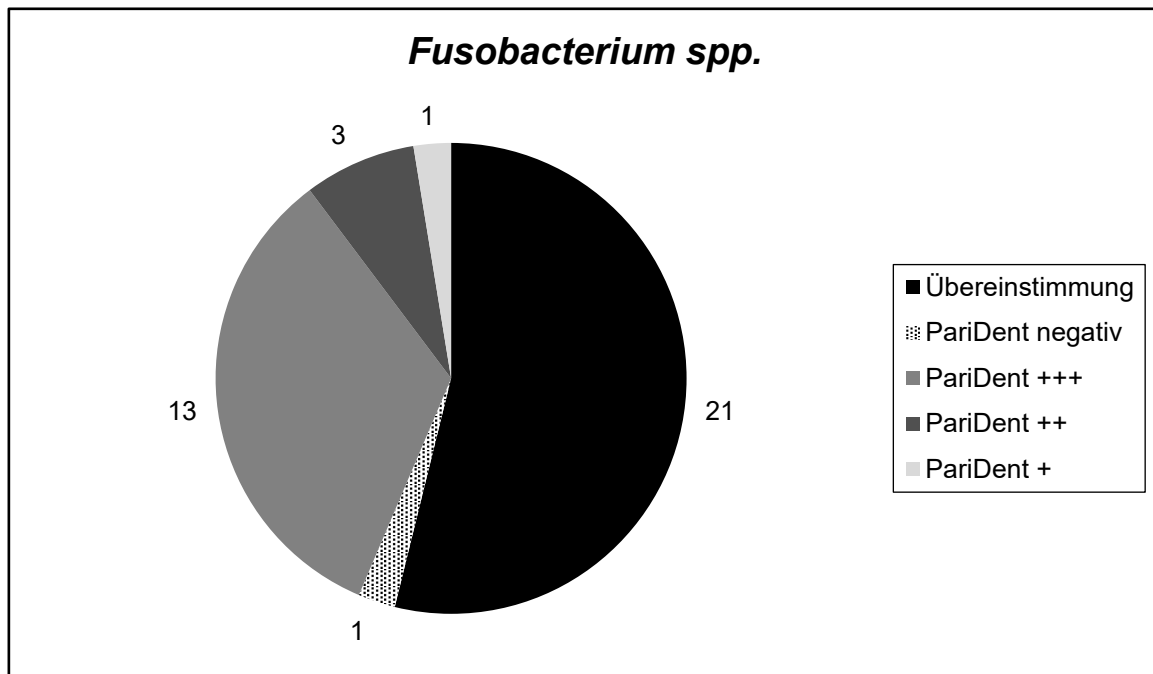


Abbildung 42: Nachweis von *Fusobacterium spp.* mit beiden Methoden

Hinsichtlich *Prevotella spp.* konnten in 46,2% der subgingivalen Plaqueproben übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden. Dies bedeutet, dass bei 18 Patienten MALDI-TOF MS und PariDent den Mikroorganismus entweder gemeinsam identifiziert, oder beide nicht nachgewiesen haben. In 12 Fällen hingegen wurde *Prevotella spp.* mit PariDent identifiziert, jedoch nicht mittels MALDI-TOF MS. Gegenteilig konnten die ribosomalen Proteine dieser Gattung mit MALDI-TOF MS in der subgingivalen Plaque von 9 Patienten bestimmt werden, obwohl PariDent hier ein negatives Ergebnis hervorbrachte. In Abbildung 43 werden diese Ergebnisse nochmals bildhaft dargestellt.

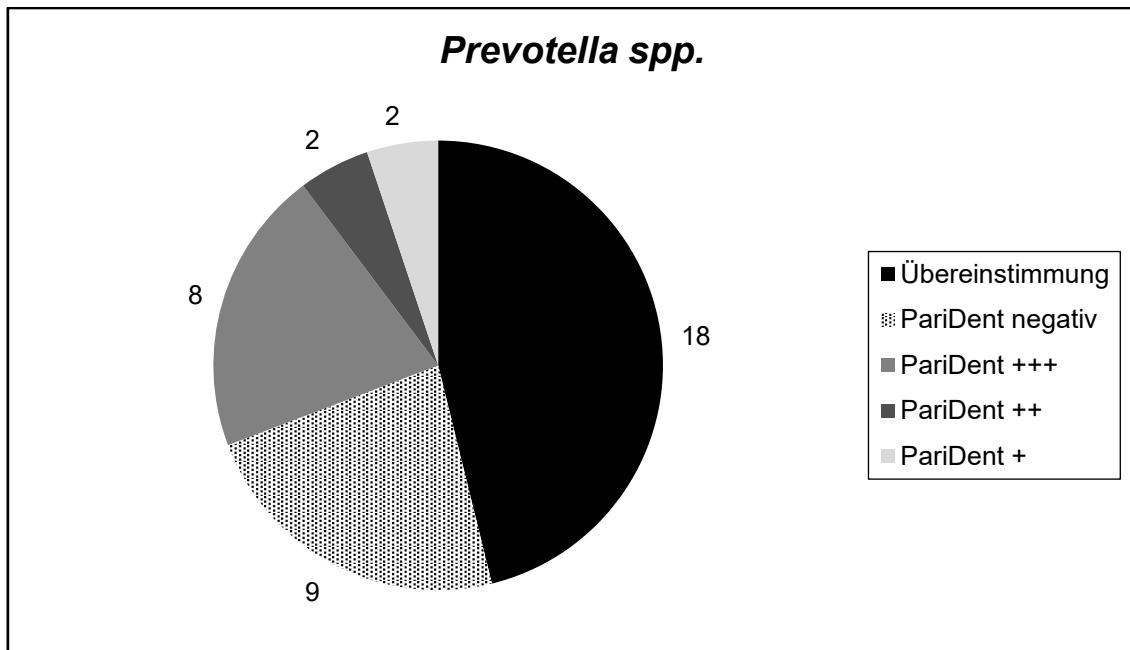


Abbildung 43: Übereinstimmung bezüglich *Prevotella spp.*

Bei *P. micra* gab es 22 und somit die meisten Übereinstimmungen zwischen PariDent und MALDI-TOF MS. Dies entspricht einem Anteil von 56,5% aller Patientenproben. Abbildung 44 verdeutlicht, dass das PariDent-Testkit den parodontitisassoziierten Mikroorganismus bei 15 Probanden identifizierte, obwohl dieser sich mittels MALDI-TOF MS nicht nachweisen ließ. In 2 Plaqueproben wurde *P. micra* hingegen mit MALDI-TOF MS identifiziert, allerdings nicht durch das PariDent-Testkit.

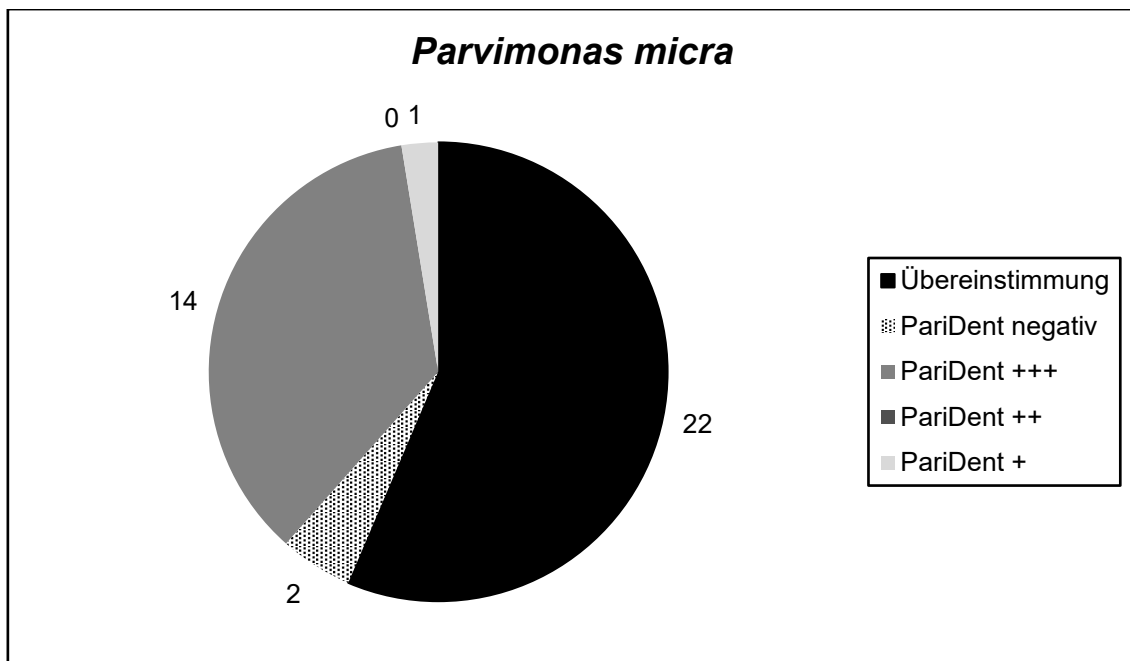


Abbildung 44: Übereinstimmung bezüglich *P. micra*

3.2.4 Korrelationen zwischen Zahnverlusten und identifizierter Spezies

Um mögliche Zusammenhänge zwischen den erhobenen klinischen Daten und den identifizierten Parodontopathogenen zu ermitteln, wurde eine Spearman-Rank Korrelation durchgeführt (Korrelationskoeffizient r). Die Korrelation wurde ab $p < 0,05$ als signifikant und ab $p < 0,01$ als hoch signifikant betrachtet.

Hinsichtlich der Identifikation von parodontitisassoziierten Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS konnte festgestellt werden, dass eine signifikant positive Korrelation zwischen dem klinischen Parameter Zahnverluste aufgrund von Parodontitis und der nachgewiesenen Gattung *Prevotella spp.* vorliegt ($r = 0,384$). Zudem bestand zwischen *P. micra* und *Prevotella spp.* eine signifikant positive Korrelation ($r = 0,381$). Dies verdeutlicht, dass bei der Untersuchung der subgingivalen Plaque mithilfe von MALDI-TOF MS, die Identifikation von *P. micra* mit dem Vorkommen von *Prevotella spp.* in den Proben einherging.

Betrachtet man das durch PariDent identifizierte Keimspektrum, so zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der Anzahl der Zahnverluste und dem Auftreten von *Prevotella spp.* ($r = 0,391$). Eine hoch signifikant positive Korrelation ergab sich hingegen zwischen dem Zahnverlust und der gemeinsamen Identifikation von *Fusobacterium spp.* und *Prevotella spp.* einerseits, sowie *P. micra* und *Prevotella spp.* andererseits ($r = 0,429$; $r = 0,557$). Eine ebenso hoch signifikant positive Korrelation wies der Parameter Zahnverlust zum gemeinsamen Nachweis von *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.* und *P. micra* durch PariDent auf ($r = 0,602$).

Interessant erscheint, dass zudem eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Zahnverlust und der Anzahl der behandlungsbedürftigen Stellen bestand ($r = 0,405$). Dies unterstreicht, dass eine hohe Anzahl nicht therapierter parodontaler Taschen mit einem vermehrten Zahnverlust einherging.

4 Diskussion

In dieser Studie sollte das MALDI-TOF MS-Verfahren hinsichtlich seiner Eignung zur Erregerdiagnostik in der Parodontologie untersucht werden. Dazu sollte die Bakterienflora der parodontalen Taschen von an Parodontitis erkrankten Patienten analysiert und die Ergebnisse mit einer klinisch etablierten PCR-basierten Methode verglichen werden.

Zur Entnahme der Proben wurden Patienten herangezogen, bei denen im Rahmen einer allgemein Zahnärztlichen Untersuchung in der Ambulanz der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie eine Parodontitis diagnostiziert wurde (Sondierungstiefe an einer Stelle mehr als 4 mm und Blutung auf Sondierung). Die Einschlusskriterien führten schließlich zu einem Patientenkollektiv mit einem durchschnittlichen Alter von $62,9 \pm 13,2$ Jahren, was wiederum auf die höhere Überlebensrate natürlicher Zähne bei älteren Altersgruppen zurückgeführt werden kann (Micheelis und Schiffner 2006). Die Auswertung der Anamnesebögen aller 39 Probanden erlaubte aussagekräftige Schlüsse über verhaltensbedingte und allgemeinmedizinische Einflussfaktoren auf die Manifestation der Parodontitis. So nahmen 61,5% der Patienten zum Zeitpunkt der Befragung Arzneimittel zu sich und knapp die Hälfte der 39 Patienten stellten Raucher dar. Lediglich bei 6 Patienten hingegen konnte ein Zusammenhang mit einer systemischen Erkrankung festgestellt werden. Allerdings muss beachtet werden, dass viele Patienten oftmals nicht von Allgemeinerkrankungen wissen. 64,1% des Patientenguts gaben an, derzeit Symptome einer Parodontitis wahrzunehmen, wohingegen bei 43,6% der Probanden bereits ein Zahnverlust aufgrund von parodontalen Erkrankungen verzeichnet werden konnte.

Der Durchschnitt wies im zahnärztlichen Befund $22,7 \pm 5,9$ Zähne auf. Durch die Bestimmung der behandlungsbedürftigen Stellen dieser Zähne, die sich durchschnittlich auf $26,8 \pm 16,9$ beliefen, konnte die Zahl der behandlungsbedürftigen Zähne ermittelt werden. So waren im Durchschnitt $12,1 \pm 5,4$ Zähne behandlungsbedürftig. Durch die Einteilung der Patienten in einzelne Risikogruppen konnte eine Übersicht über das Ausmaß der parodontalen Destruktion der Probanden erreicht werden (vgl. Abbildung 31 und Abbildung 32).

Bezüglich der mikrobiologischen Auswertung muss primär festgestellt werden, dass mithilfe von MALDI-TOF MS bei allen 39 Patienten die bakterielle Flora der subgingivalen Plaque bestimmt werden konnte. Es wurden in jeder Patientenprobe durchschnittlich $7,0 \pm 2,5$ Bakterienspezies mit einem score-value > 2 identifiziert. Diese waren insgesamt 61 verschiedenen Spezies in Bezug auf alle 39 Proben zugehörig. Das bedeutet, dass die in der anaeroben Kammer zuvor angezüchteten Keime problemlos mittels MALDI-TOF MS nachgewiesen werden konnten. Lediglich bei 8,9% aller untersuchten Reinkulturen konnte mittels MALDI-TOF MS kein ausreichend valides Ergebnis erzielt werden. In der Vergangenheit haben bereits mehrere Studien über das große Potenzial der MALDI-TOF MS-Diagnostik zur Identifikation von klinisch relevanten Anaerobiern berichtet, wobei jeweils unterschiedliche Identifizierungsraten genannt wurden (Barba *et al.* 2014; Coltella *et al.* 2013; Kist *et al.* 2016; Schmitt *et al.* 2013). In einer Studie aus dem Jahr 2016 verglichen Rodriguez-Sánchez und Mitarbeiter MALDI-TOF MS mit einem traditionellen biochemischen Testverfahren, wobei die 16S rRNA-Genbasierte Identifikation als Referenzmethode zum Einsatz kommt. So wurde bei 76,6% der Anaerobier mittels MALDI-TOF MS die korrekte Spezies mit einem score-value ≥ 2 identifiziert. Die Extraktion der ribosomalen Proteine der Erreger erfolgte hierbei durch das Pipettieren von 1 μ l 100%-iger Ameisensäure auf die Probe (Rodriguez-Sanchez *et al.* 2016).

In unserer Studie wurden *S. oralis*, *P. micra*, *A. odontolyticus* und *F. nucleatum* am häufigsten unter Verwendung von MALDI-TOF MS in den Patientenproben identifiziert. Nachgewiesene Bakteriengattungen mit den meisten Vertretern stellten *Streptococcus spp.*, *Prevotella spp.*, *Actinomyces spp.*, *Campylobacter spp.*, *Capnocytophaga spp.* und *Fusobacterium spp.* dar. Beim Vergleich unserer Ergebnisse mit anderen Untersuchungen muss diesbezüglich angemerkt werden, dass es bisher nur wenige Studien über den spezifischen Nachweis von oralen Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS gibt. Durch ein ähnliches Vorgehen wie in unserem Versuchsaufbau identifizierten Kist und Mitarbeiter in ihrer Studie ebenfalls am häufigsten *Streptococcus spp.*, *Parvimonas spp.* und *Prevotella spp.* mithilfe von MALDI-TOF MS. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Probenmaterial aus den Wurzelkanälen von Zähnen mit apikaler Parodontitis stammte (Kist *et al.* 2016). In einer Untersuchung von Goeke und Mitarbeitern

find das Verfahren der MALDI-TOF MS bei der Identifikation der mit Karies assoziierten Spezies *S. mutans*, *A. naeslundii* und *Lactobacillus spp.* Anwendung (Goeke *et al.* 2018). In einer weiteren Studie wird dargelegt, dass die massenspektrometrische Analyse bezüglich der Bakteriengattung *Prevotella spp.* alle Proben der richtigen Gattung zuordnete und in 88,6% der Fälle die korrekte Spezies mit einem score-value ≥ 2 identifizierte (Gursoy *et al.* 2017). So scheint das MALDI-TOF MS-Verfahren ein vielversprechender Ansatz für die Identifikation von oralen Spezies dieser Gattung zu sein. Beachtet werden muss jedoch, dass in dieser Studie durch ein biochemisches Testverfahren zuvor sichergestellt wurde, dass ausschließlich *Prevotella spp.* in der Probe vorhanden war und die Analyse nur auf eine einzige Gattung ausgerichtet wurde (Gursoy *et al.* 2017). Dies vereinfacht die Untersuchungsbedingungen im Vergleich zu unserer Studie erheblich, da die MALDI-TOF MS-Diagnostik bei uns ohne vorherige Eingrenzung der Erreger durchgeführt wurde. Ein ähnlicher Sachverhalt lässt sich auch bei einer Studie aus dem Jahr 2008 über den Nachweis von anaeroben Bakterien der subgingivalen Plaque erkennen. Die Studie postuliert eine erfolgreiche Identifikation von Parodontopathogenen des subgingivalen Biofilms von 33 Patienten mit aggressiver Parodontitis. Hierbei waren die Spezies vor der MALDI-TOF MS-Analyse ebenso bekannt, was theoretisch eine gezielte Auswahl der zu untersuchenden Mikroorganismen möglich machte (Stingu *et al.* 2008). Dies entspricht jedoch nicht den klinischen Gegebenheiten, da in der Regel nicht klar ist, welche Pathogene in einer Patientenprobe vorliegen. Der nahe Praxisbezug unseres Versuchsaufbaus wird dadurch einmal mehr unterstrichen. Auch eine weitere Studie, die sich mit der Detektion von oralen Spezies der Gattung *Actinomyces spp.* befasst, lässt sich nur sehr schwer mit unserer Untersuchung vergleichen, da auch hier der Schwerpunkt auf die Detektion von Spezies einer einzigen Gattung gelegt wurde. Zudem wurden die Keime hierbei in gleicher Weise mit biochemischen Testverfahren vor der MALDI-TOF MS-Diagnostik identifiziert (Stingu *et al.* 2015).

Hinsichtlich relevanter parodontopathogener Mikroorganismen wurden diese mithilfe von MALDI-TOF MS durch Vertreter von *Campylobacter spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.* sowie *P. micra* in unserer Studie nachgewiesen (vgl. Abbildung 40). So konnten in Bezug auf diese

Keime am häufigsten Spezies der Gattung *Prevotella spp.* und *Fusobacterium spp.* in der subgingivalen Plaque der Patienten identifiziert werden. Dies legt den Schluss nahe, dass der Schwerpunkt der MALDI-TOF MS-Diagnostik insbesondere in der Identifikation von Keimen des orangen Komplexes liegt. Das wird allerdings in einer Studie aus dem Jahr 2016 widerlegt, in welcher Alves und Mitarbeiter die subgingivale Plaque von 30 Patienten unter Verwendung von MALDI-TOF MS analysieren. So wurde unter anderem bei 50% des Patientenkollektivs *A. actinomycetemcomitans* und bei 27% der Probanden *T. forsythia* nachgewiesen, wobei insgesamt nur 16 verschiedene Bakterienspezies und somit deutlich weniger Spezies als in unserer Studie identifiziert wurden. *P. gingivalis* und *T. denticola* als weitere Vertreter des roten Komplexes wurden hierbei nicht nachgewiesen. Die Ergebnisse müssen jedoch durchaus kritisch beurteilt werden, da in der aufgeführten Studie weder die Probenentnahme noch das genaue Vorgehen bei der kulturellen Anzucht der Bakterien erläutert wurde (Alves *et al.* 2016).

Eine mögliche Erklärung für das identifizierte Keimspektrum in unserer Studie könnte die Erschwernis bei der Probenentnahme, beim Transport und bei der Vorkultur der Parodontopathogene sein. Einerseits kann in dem kurzen Zeitraum zwischen Probenentnahme mit sterilen Papierspitzen und Lagerung in einem geeigneten Transportmedium kein anaerobes Milieu garantiert werden, was zum Absterben einzelner Keime führen könnte. Andererseits erweist sich die kulturelle Anzucht von Anaerobiern als sehr schwierig. Es zeichnen sich einige Erreger, wie beispielsweise *T. forsythia*, durch sehr anspruchsvolle Wachstumsbedingungen und verlängerte Inkubationszeiten aus. So erfordert die Anzucht von *T. forsythia* die Anwesenheit von N-Acetylmuraminsäure, wobei auch Hämin, L-Cystein und Menadion wachstumsstimulierend wirken können (Tanner und Izard 2006; Wyss 1989). Gelingt in diesen Fällen trotzdem keine Isolierung einer Reinkultur, entgeht der Mikroorganismus folglich der MALDI-TOF MS-Diagnostik. Eine weitere Problematik entsteht auch, wenn aus der Bakterienkultur eine zu geringe Menge des Erregers hervorgeht, die nicht für die Extraktion ribosomaler Proteine ausreicht und somit ebenfalls nicht mit der massenspektrometrischen Analyse nachweisbar ist. Zu guter Letzt stellt die Aufrechterhaltung eines ausreichend anaeroben Milieus bei der Bakterienkultur generell eine Herausforderung dar.

Unterstrichen wird dieser Sachverhalt durch zahlreiche Studien, die den erschweren Nachweis von parodontopathogenen Markerkeimen wie *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* und *T. forsythia* mittels Bakterienkultur im Vergleich zu molekularbiologischen Verfahren postulieren (Atieh 2008; Bankur *et al.* 2014; Riggio *et al.* 1996). Zusammenfassend kann hierbei festgestellt werden, dass die Grenzen der MALDI-TOF MS-basierten Diagnostik in der Probengewinnung und vor allem der Anzuchtbarkeit der jeweiligen Infektionserreger begründet liegen (La Scola *et al.* 2011). Nicht zu vergessen ist ferner der mit Kulturmethode einhergehende erhöhte Personalaufwand im Labor.

Mittels PariDent wurden die subgingivalen Plaqueproben in unserer Studie auf das Vorliegen von 7 parodontitisassoziierten Mikroorganismen untersucht. Am häufigsten wurden dabei *F. nucleatum* und *T. forsythia* identifiziert. Die genaue Verteilung der Parodontopathogene in den Patientenproben kann aus Abbildung 41 des Ergebnisteils entnommen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass bei der PCR-basierten Methode im Vergleich zur MALDI-TOF MS die Keime des roten Komplexes durchaus nachweisbar waren. So wurde *P. gingivalis* bei 23,1% der Proben, *T. forsythia* bei 92,3% und *T. denticola* bei 76,9% der Patienten identifiziert. Im Allgemeinen existieren zahlreiche Studien, die die hohe Sensitivität von PCR-basierenden Diagnostikmethoden in Bezug auf bekannte Markerkeime parodontaler Erkrankungen hervorheben (Mayanagi *et al.* 2004; Riggio *et al.* 1996; Takeuchi *et al.* 2003). Zurückführen lässt sich das unter anderem darauf, dass bei molekularbiologischen Testverfahren bereits geringe Mengen des Erregers zum Nachweis ausreichen. So analysierten beispielsweise Ready und Mitarbeiter die subgingivale Plaque von 107 Patienten mit schwerer generalisierter Parodontitis und konzentrierten sich dabei auf die Identifikation der 3 Markerkeime *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* und *T. forsythia*. Mithilfe eines Multiplex-PCR-Ansatzes konnte *T. forsythia* sodann bei 81%, *P. gingivalis* bei 78% und *A. actinomycetemcomitans* bei 47% des Patientenguts nachgewiesen werden (Ready *et al.* 2008). Auch die supragingivale Plaque wurde in den vergangenen Jahren mittels PCR hinsichtlich parodontopathogener Bakterien vielfach untersucht, wobei man zur Erkenntnis kam, dass die supra- und subgingivale Plaque bei vorliegenden parodontalen Erkrankungen eine ähnliche bakterielle Flora aufweisen (Moore *et al.* 1983; Ximenez-Fyvie *et al.* 2000). Eine Studie aus

dem Jahr 2001 ergab, dass mithilfe der PCR unter anderem *T. forsythia*, *T. denticola* und *P. nigrescens* mit einer hohen Prävalenz in der supragingivalen Plaque von Kindern nachweisbar waren. Die Probenentnahme erfolgte dabei allerdings mit Zahnbürsten, wobei das genaue Vorgehen in diesem Zusammenhang nicht näher erläutert wurde (Okada *et al.* 2001).

Schlussendlich machen die Studien deutlich, dass mittels PCR-basierten Diagnostikmethoden parodontopathogene Markerkeime tendenziell häufiger nachgewiesen werden als mit anderen Verfahren. Zurückführen lässt sich das unter anderem darauf, dass bei Nukleinsäure-basierenden Methoden keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Mikroorganismen erfolgt. Es handelt sich somit bei PariDent vielmehr um einen indirekten Nachweis der Infektionserreger, da die PCR lediglich deren DNA in der Probe detektiert. Ferner können mit PCR-basierten Diagnostikmethoden durch die Auswahl spezifischer Primer nur jene Bakterien identifiziert werden, die auch in der Probe vermutet werden. So konnten in unserem Fall mithilfe von PariDent nur 7 Parodontopathogene in den Proben nachgewiesen werden. MALDI-TOF MS stellt hingegen ein offenes System dar, mit welchem theoretisch alle Mikroorganismen in einer Probe identifiziert werden können, sofern genügend Referenzspektren für eine Spezies in der Datenbank hinterlegt sind. Von Vorteil ist außerdem, dass eine Erweiterung der Referenzdatenbank durch die Integration von Massenspektren neuer Isolate ohne großen finanziellen Aufwand jederzeit möglich ist.

Beim Vergleich der Ergebnisse zwischen beiden Diagnostikmethoden konnte festgestellt werden, dass ausschließlich die 3 parodontalpathogenen Keime *F. nucleatum*, *P. intermedia* und *P. micra* sowohl mit MALDI-TOF MS als auch mit PariDent identifiziert wurden. Bei der weiteren Auswertung der Ergebnisse wurde sodann angenommen, dass das PariDent-Testkit auch dann ein positives Ergebnis für einen Erreger liefert, sobald ein Vertreter der jeweiligen Bakteriengattung in der Probe vorliegt. So wurden hinsichtlich *P. micra* sowie *Fusobacterium spp.* und *Prevotella spp.* die meisten Übereinstimmungen bei *P. micra* zwischen MALDI-TOF MS und PariDent erzielt. Im Einzelnen bedeutet das, dass die beiden Diagnostikmethoden bei 56,5% der Patientenproben für *P. micra*, bei 53,8% für *Fusobacterium spp.* und bei 46,2% der Proben für *Prevotella spp.* ein übereinstimmendes Ergebnis lieferten. Eine ähnliche Entsprechung zwischen

dem MALDI-TOF MS-Verfahren und einer PCR-basierten Methode wurde in einer Studie aus dem Jahr 2011 erreicht. Dabei wurden insgesamt 410 Isolate untersucht, die 207 verschiedenen Spezies zugehörig waren. Letztlich konnte mittels MALDI-TOF MS im Vergleich zum PCR-Ansatz bei 45,9% der Proben eine übereinstimmende Identifikation mit einem score-value ≥ 2 erzielt werden (Bizzini *et al.* 2011). Da die MALDI-TOF MS-basierte Erregeridentifizierung auf der Analyse des Proteinprofils von vornehmlich ribosomalen Proteinen beruht, gleichen die Differenzierungsmuster gewiss denen der 16S-rRNA-Sequenzvergleiche. Dennoch muss auch beachtet werden, dass in unserer Studie in knapp der Hälfte der Proben diskordante Ergebnisse zwischen MALDI-TOF MS und PariDent in Bezug auf die 3 gemeinsam identifizierten Parodontopathogene erreicht wurden. Interessant erscheint, dass bei einer Unstimmigkeit der Resultate das PariDent-Testkit in den allermeisten Fällen ein positives Ergebnis für einen Infektionserreger lieferte, obwohl mittels MALDI-TOF MS keine Identifikation erzielt wurde. Dies kann auch darauf zurückgeführt werden, dass bei der Diagnostik mittels PariDent keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Mikroorganismen erfolgt, was wiederum zu einem falsch positiven Ergebnis und somit zu falschen Schlussfolgerungen bei der Parodontitistherapie führen könnte.

Bei der Korrelation einzelner klinischer Parameter mit dem durch MALDI-TOF MS und PariDent identifizierten Keimspektrum war auffällig, dass die Anzahl der Zahnverluste bei beiden Diagnostikmethoden mit dem Nachweis von Spezies der Gattung *Prevotella spp.* signifikant positiv korreliert. Außerdem zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Zahnverlust und der Anzahl behandlungsbedürftiger Stellen. Das verdeutlicht einmal mehr, dass eine mangelhafte Therapie von parodontalen Erkrankungen mit vermehrtem Zahnverlust einhergeht.

Das übergeordnete Ziel unserer Studie war es, einen Beitrag zur Verbesserung der mikrobiologischen Diagnostik bei parodontalen Erkrankungen zu leisten. Dazu sollte das Potenzial der MALDI-TOF MS zur Identifikation von parodontopathogenen Bakterien untersucht werden. Wir kamen zu der Erkenntnis, dass mithilfe des MALDI-TOF MS-Verfahrens vornehmlich ein Nachweis von Parodontopathogenen des orangen Komplexes möglich war. Zudem wurden insgesamt 61 verschiedene Spezies mit einem score-value > 2 in den Proben

identifiziert, was wiederum die hohe Validität unserer Differenzierungsergebnisse unterstreicht. So gelang uns mittels MALDI-TOF MS ein sehr präziser Nachweis von durchschnittlich $7,0 \pm 2,5$ Bakterienspezies in jeder Patientenprobe. Zugegebenermaßen konnten mithilfe von PariDent einzelne parodontopathogene Markerkeime häufiger identifiziert werden, es muss jedoch diesbezüglich angemerkt werden, dass eine Einstufung der Validität der Ergebnisse in diesem Fall nicht möglich war. Außerdem beschränkte sich das PariDent-Testkit auf den Nachweis von lediglich 7 parodontitisassoziierten Mikroorganismen in den Patientenproben. Andere relevante Keime, so vorhanden, entgingen somit der Analyse und können dadurch bei der Auswahl eines auf die vorliegende Infektion ausgerichteten Antibiotikums nicht miteinbezogen werden.

In unserem Versuchsaufbau erfolgte vor der massenspektrometrischen Analyse eine Kultivierung der Bakterien mit anschließender Isolierung von Reinkulturen, um die Entstehung von gemischten Massenspektren bei der MALDI-TOF MS-Diagnostik zu vermeiden. So konnte danach eine Stammerhaltung der Keime in BHI mit 10% Glycerin vorgenommen werden. Das heißt, dass eine erneute Kultivierung der Bakterien nach deren Identifikation durch MALDI-TOF MS theoretisch jederzeit möglich war. Dieses Verfahren bietet also im Gegensatz zu PariDent die Option weitere Untersuchungen nach der Keimdifferenzierung vorzunehmen. Diese Gegebenheit stellt insbesondere in Bezug auf die Antibiotika-Resistenzbestimmung einen klaren Vorteil dar.

Eine ernstzunehmende Problematik bei der Therapie von anaeroben Infektionen ist die steigende Resistenzrate der Erreger gegenüber gängigen Antibiotika (Brook 2016). In den letzten Jahren sind in der Literatur immer mehr Hinweise auf die zunehmende Resistenz gegenüber Metronidazol aufgetreten, welches sich immer noch als Antibiotikum der Wahl bei der Behandlung von anaeroben Infektionen erweist, insbesondere auch bei parodontalen Erkrankungen (Brook 2016; Lofmark *et al.* 2010; Soares *et al.* 2012). In Bezug auf parodontitisassoziierte Mikroorganismen konnte dies bisher vor allem bei *P. micra*, *P. intermedia* und *S. constellatus* beobachtet werden (Rams *et al.* 2014). Eine Studie aus dem Jahr 2015 beschreibt hingegen die vermehrte Bildung von β -Laktamasen durch Parodontopathogene, die aus der subgingivalen Plaque von Patienten mit chronischer Parodontitis isoliert wurden. So wurde besonders bei *P. intermedia*

eine erhöhte β -Laktamase-Produktion erfasst (Fernandez-Canigia *et al.* 2015). Rams und Mitarbeiter untersuchten 2014 in ihrer Studie subgingivale Plaqueproben von 400 Patienten und konnten bei 74,2% des Patientenkollektivs resistente parodontopathogene Bakterien feststellen. Im Einzelnen bedeutet das, dass bei 296 Patienten Parodontopathogene mit einer nachgewiesenen Resistenz gegenüber mindestens eines der Antibiotika Amoxicillin, Clindamycin, Doxycyclin und Metronidazol erfasst wurden. Besonders interessant erscheint, dass bei 15,0% des Patientenguts die isolierten Infektionserreger eine Resistenz gegenüber Amoxicillin und gleichzeitig gegenüber Metronidazol (van-Winkelhoff-Cocktail) zeigten (Rams *et al.* 2014). In Europa sind in Bezug auf parodontopathogene Keime große Unterschiede im Auftreten von Antibiotikaresistenzen zwischen den Ländern erkennbar. So führte beispielsweise im Vergleich zu den Niederlanden der vermehrte Gebrauch von Antibiotika in Spanien zu einem höheren Anteil resistenter Bakterien in der subgingivalen Plaque von Parodontitispatienten (van Winkelhoff *et al.* 2000). Dadurch wird verdeutlicht, dass der vielfältige und achtlose Gebrauch von Antibiotika zur Entstehung resistenter Pathogene beiträgt. Insgesamt muss also dem adäquaten Antibiotikaeinsatz bei der Therapie parodontaler Erkrankungen besondere Beachtung gewährt werden. Diesbezüglich erlaubt die MALDI-TOF MS-Diagnostik nach der Speziesbestimmung eine erneute Kultivierung der Bakterien, wobei im Folgenden beispielsweise mithilfe eines Epsilometer-Tests (E-Test) eine Resistenzprüfung gegen in der Parodontologie gebräuchliche Antibiotika ohne Weiteres durchgeführt werden kann. Auf diese Weise konnten auch Dahlen und Preus die Resistenz einer Vielzahl isolierter Parodontopathogene gegenüber Metronidazol, Penicillin, Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulansäure und Clindamycin untersuchen (Dahlen und Preus 2017). Das MALDI-TOF MS-Verfahren lässt sich also problemlos mit Resistenzbestimmungsmethoden kombinieren, was letztlich die gezielte Auswahl eines zweckmäßigen Antibiotikums möglich macht.

Zu guter Letzt zeichnet sich das MALDI-TOF MS-Verfahren durch sehr geringe Verbrauchskosten aus. So wurde in einer Studie aus dem Jahr 2010 über eine deutliche Kostenersparnis bei der massenspektrometrischen Diagnostik gegenüber traditionellen biochemischen Testverfahren berichtet (Cherkaoui *et al.* 2010). Zudem können durch eine Verbesserung der Vorbereitungsprotokolle der

Proben neben einer Kostenreduktion auch kürzere Analysenzeiten im Vergleich zu molekularbiologischen Diagnostikmethoden erreicht werden (Zhou *et al.* 2017).

Unsere Studie vergleicht erstmals das Verfahren der MALDI-TOF MS mit einer klinisch etablierten PCR-basierten Methode hinsichtlich der Identifikation von parodontitisassoziierten Mikroorganismen. Wie vermutet, konnte bei einzelnen parodontopathogenen Erregern, die durch PariDent identifiziert wurden, keine kulturelle Anzucht und folglich auch kein massenspektrometrischer Nachweis erreicht werden. So wurden mittels MALDI-TOF MS im Gegensatz zu PariDent vorwiegend Keime des orangen Komplexes in den Proben nachgewiesen.

Bezüglich der zu Anfang gestellten Hypothese kann festgehalten werden, dass diese zum großen Teil akzeptiert werden kann. Uns gelang die Isolierung von parodontalpathogenen Keimen aus der subgingivalen Plaque aller 39 Patienten durch deren Kultivierung in einem ausreichend anaeroben Milieu. Das führte schließlich zu einer erfolgreichen Identifikation von insgesamt 61 verschiedenen Bakterienspezies in den Patientenproben. Die Ergebnisse unserer Studie geben Aufschluss über die Präzision der MALDI-TOF MS bezüglich der Speziesdifferenzierung von Parodontopathogenen und unterstreichen sogleich die Vorteile dieses Verfahrens gegenüber molekularbiologischen Methoden.

Eine Limitierung der MALDI-TOF MS-Analyse ist bislang, dass die direkte Identifikation von Spezies aus Patientenproben nur sehr schwer möglich ist und somit fast immer eine Vorkultur erfolgen muss. Aktuelle Entwicklungsarbeiten sind auf den Direktnachweis von Infektionserregern ausgerichtet, wobei hinsichtlich positiver Blutkulturen und Urinproben bereits Erfolg versprechende Vorbereitungsprotokolle entwickelt wurden (Schubert und Wieser 2011). Sollte es in Zukunft gelingen, mithilfe von MALDI-TOF MS auch Bakteriengemische ohne vorherige Kultivierung der Bakterien zu identifizieren, so hätte das massenspektrometrische Verfahren durchaus das Potenzial die molekularbiologischen Methoden allgemein abzulösen. Somit wäre ein Einzug der MALDI-TOF MS in den Bereich der Parodontologie denkbar.

Angesichts der hohen Präzision, der kurzen Analysenzeiten und der niedrigen Kosten der MALDI-TOF MS, wäre dann eine Aufnahme der mikrobiologischen Diagnostik in den Leistungskatalog der gesetzlichen Krankenversicherung

ebenfalls vorstellbar. So kann die MALDI-TOF MS einen ersten Schritt zur Verbesserung der Therapie von parodontalen Erkrankungen darstellen.

5 Zusammenfassung

Das Verfahren der MALDI-TOF MS stellt in der mikrobiologischen Diagnostik einen vollkommen neuartigen Ansatz zur Differenzierung von Mikroorganismen dar und hat in den letzten Jahren durch Verfeinerung der Methodik sogar Routinetauglichkeit erlangt. Die massenspektrometrische Diagnostikmethode beruht dabei auf der Analyse des Proteinprofils von vorwiegend ribosomalen Proteinen einer Bakterien- oder Pilzkultur. Die Speziesbestimmung erfolgt schließlich durch einen vollautomatischen Abgleich der ermittelten Massenspektren mit einer Referenzdatenbank, die eine Vielzahl von Spektren bekannter eingeleiteter Isolate enthält. Diese Studie vergleicht erstmalig das MALDI-TOF MS-Verfahren mit einer klinisch etablierten PCR-basierten Methode (PariDent) in Bezug auf die Identifikation von parodontitisassoziierten Mikroorganismen.

Die Isolierung der Parodontopathogene aus der subgingivalen Plaque von 39 Patienten mit diagnostizierter Parodontitis (Sondierungstiefe an 4 Stellen mehr als 4 mm und Blutung auf Sondierung) wurde durch eine Vorkultur der Infektionserreger in einer anaeroben Kammer erreicht. Im Gegensatz zu molekularbiologischen Methoden können mittels MALDI-TOF MS alle anzüchtbaren Mikroorganismen nachgewiesen werden und nicht nur jene, die in einer Probe vermutet werden. So wurden mithilfe von MALDI-TOF MS durchschnittlich $7,0 \pm 2,5$ verschiedene parodontopathogene Erreger pro Patientenprobe identifiziert, die insgesamt 61 unterschiedlichen Bakterienspezies zugehörig waren. In Bezug auf relevante Parodontopathogene wurden in 29 Proben Spezies der Gattung *Prevotella spp.* und bei 27 Patienten Spezies der Gattung *Fusobacterium spp.* detektiert. Die massenspektrometrische Analyse ermöglichte überwiegend einen Nachweis von Keimen des orangen Komplexes, wohingegen durch PariDent auch Keime des roten Komplexes in den Proben identifiziert wurden. Allerdings erlaubte die PCR-basierte Methode lediglich einen Nachweis von 7 verschiedenen Bakterienspezies, wobei *F. nucleatum* und *T. forsythia* am häufigsten detektiert wurden. Beim Vergleich der Ergebnisse zwischen beiden Diagnostikmethoden konnte festgestellt werden, dass bezüglich *P. micra* die meisten Übereinstimmungen erzielt wurden, was wiederum einem Anteil von 56,5% aller Patientenproben entspricht.

Eine Limitierung der MALDI-TOF MS stellt bislang die Anzuchtbarkeit der Mikroorganismen dar, da für die massenspektrometrische Analyse fast immer eine Vorkultur erfolgen muss. Weitere Studien sind nötig, die auf die Verbesserung von Vorbereitungsprotokollen ausgerichtet sind, um gegebenenfalls sogar einen Direktnachweis von parodontalpathogenen Keimen aus Patientenproben zukünftig zu ermöglichen. Ein Einzug der MALDI-TOF MS in den Bereich der Parodontologie wäre dann durchaus denkbar, da es wesentliche Vorteile wie kurze Analysenzeiten und hohe Präzision bietet. Zudem könnte im Vergleich zu den bisher angewandten molekularbiologischen Methoden mittels MALDI-TOF MS eine deutliche Kostenreduktion bei der mikrobiologischen Diagnostik erzielt werden. Somit wäre eine Aufnahme der Identifizierung von parodontalpathogenen Keimen in den Leistungskatalog der gesetzlichen Krankenversicherung vorstellbar. Dies wäre vorteilhaft, da insbesondere bei schweren Verlaufsformen der Parodontitis oftmals der zusätzliche Einsatz systemischer Antibiotika nötig ist, was wiederum eine genaue Kenntnis über die in der subgingivalen Plaque vorhandene parodontalpathogene Flora voraussetzt. Das Verfahren der MALDI-TOF MS könnte demnach einen Beitrag zur Verbesserung der Therapie von parodontalen Erkrankungen leisten.

Zusammenfassend gibt diese Studie Aufschluss über die gegenwärtigen Möglichkeiten und Grenzen der MALDI-TOF MS bei der Identifikation von parodontitisassoziierten Mikroorganismen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N. **2010**. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J Periodontal Res.* 45(3):389-395.
2. Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. **2000**. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol.* 71(12):1874-1881.
3. Altun O, Botero-Kleiven S, Carlsson S, Ullberg M, Ozenci V. **2015**. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS following short-term incubation on solid media. *J Med Microbiol.* 64(11):1346-1352.
4. Alves LA, Souza RC, da Silva TM, Watanabe A, Dias M, Mendes MA, Ciamponi AL. **2016**. Identification of microorganisms in biofluids of individuals with periodontitis and chronic kidney disease using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 30(10):1228-1232.
5. Anderson AC, Sanunu M, Schneider C, Clad A, Karygianni L, Hellwig E, Al-Ahmad A. **2014**. Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol.* 14:312.
6. Armitage GC. **2010**. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 53:70-88.
7. Atieh MA. **2008**. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol.* 79(9):1620-1629.
8. Bankur PK, Nayak A, Bhat K, Bankur R, Naik R, Rajpoot N. **2014**. Comparison of culture and polymerase chain reaction techniques in the identification of *Tannerella forsythia* in periodontal health and disease, an in vitro study. *J Indian Soc Periodontol.* 18(2):155-160.
9. Barba MJ, Fernandez A, Oviano M, Fernandez B, Velasco D, Bou G. **2014**. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe.* 30:126-128.
10. Barreau M, Pagnier I, La Scola B. **2013**. Improving the identification of anaerobes in the clinical microbiology laboratory through MALDI-TOF mass spectrometry. *Anaerobe.* 22:123-125.

11. Beikler T, Karch H, Flemmig TF. **2003**. Wissenschaftliche Stellungnahme Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde: Adjuvante Antibiotika in der Parodontitistherapie.
12. Beikler T, Karch H, Flemmig TF. **2005**. Mikrobiologische Diagnostik in der Parodontitistherapie: Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten (DGZMK).
13. Beikler T, Prior K, Ehmke B, Flemmig TF. **2004**. Specific antibiotics in the treatment of periodontitis--a proposed strategy. *J Periodontol*. 75(1):169-175.
14. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. **2010**. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 48(5):1549-1554.
15. Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'hom G, Greub G. **2011**. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol*. 49(2):693-696.
16. Bonta Y, Zambon JJ, Genco RJ, Neiders ME. **1985**. Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival plaque: Comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res*. 64(5):793-798.
17. Brook I. **2016**. Spectrum and treatment of anaerobic infections. *J Infect Chemother*. 22(1):1-13.
18. Burchard KW, Minor LB, Slotman GJ, Gann DS. **1984**. Staphylococcus epidermidis sepsis in surgical patients. *Arch Surg*. 119(1):96-100.
19. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. **1999**. The calgary biofilm device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*. 37(6):1771-1776.
20. Cheng K, Chui H, Domish L, Hernandez D, Wang G. **2016**. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *Proteomics Clin Appl*.
21. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J. **2010**. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol*. 48(4):1169-1175.

22. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. **1996**. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*. 14(11):1584-1586.
23. Clerehugh V, Seymour GJ, Bird PS, Cullinan M, Drucker DB, Worthington HV. **1997**. The detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* using an ELISA in an adolescent population with early periodontitis. *J Clin Periodontol*. 24(1):57-64.
24. Coltella L, Mancinelli L, Onori M, Lucignano B, Menichella D, Sorge R, Raponi M, Mancini R, Russo C. **2013**. Advancement in the routine identification of anaerobic bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 32(9):1183-1192.
25. Consensus report. Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. **1996**. *Ann Periodontol*. 1(1):926-932.
26. Dahlen G, Preus HR. **2017**. Low antibiotic resistance among anaerobic gram-negative bacteria in periodontitis 5 years following metronidazole therapy. *Anaerobe*. 43:94-98.
27. D'Ercole S, Catamo G, Tripodi D, Piccolomini R. **2008**. Comparison of culture methods and multiplex PCR for the detection of periodontopathogenic bacteria in biofilm associated with severe forms of periodontitis. *New Microbiol*. 31(3):383-391.
28. Fernandez-Canigia L, Cejas D, Gutkind G, Radice M. **2015**. Detection and genetic characterization of beta-lactamases in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from oral cavity infections and peritonsillar abscesses. *Anaerobe*. 33:8-13.
29. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM, Munoz-Bellido JL. **2010**. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 48(6):2110-2115.
30. Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M. **2010**. Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde: Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie. 3., unver. Aufl., Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
31. Goeke JE, Kist S, Schubert S, Hickel R, Huth KC, Kollmuss M. **2018**. Sensitivity of caries pathogens to antimicrobial peptides related to caries risk. *Clin Oral Investig*. 22(7):2519-2525.
32. Graves DT, Jiang Y, Genco C. **2000**. Periodontal disease: Bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. *Curr Opin Infect Dis*. 13(3):227-232.

33. Greenstein G. **1988**. Microbiologic assessments to enhance periodontal diagnosis. *J Periodontol.* 59(8):508-515.
34. Gursoy M, Harju I, Matomaki J, Bryk A, Kononen E. **2017**. Performance of MALDI-TOF MS for identification of oral *Prevotella* species. *Anaerobe.* 47:89-93.
35. Haigh J, Degun A, Eydmann M, Millar M, Wilks M. **2011**. Improved performance of bacterium and yeast identification by a commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 49(9):3441.
36. Hellwig E, Klimek J, Attin T. **2013**. Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie. 6., überarb. Aufl., Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln.
37. Hof H, Dörries R. **2014**. Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. 5., vollst. überarb. Aufl., Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
38. Jarman KH, Cebula ST, Saenz AJ, Petersen CE, Valentine NB, Kingsley MT, Wahl KL. **2000**. An algorithm for automated bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 72(6):1217-1223.
39. Jervoe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dorfler A, Jepsen S. **2005**. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 32(7):778-783.
40. Jordan AR, Micheelis W. **2016**. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V). Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV GmbH, Köln.
41. Kayser F, Böttger E, Deplazes P, Haller O, Roers A. **2014**. Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. 13., vollst. überarb. und erw. Aufl., Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
42. Kist S, Kollmuss M, Jung J, Schubert S, Hickel R, Huth KC. **2016**. Comparison of ozone gas and sodium hypochlorite/chlorhexidine two-visit disinfection protocols in treating apical periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig.*
43. Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, Schubert S. **2013**. MALDI-TOF MS: An upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics Clin Appl.* 7(11-12):767-778.
44. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L et al. **2006**. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 34(6):1589-1596.

45. La Scola B, Fournier PE, Raoult D. **2011**. Burden of emerging anaerobes in the MALDI-TOF and 16S rRNA gene sequencing era. *Anaerobe*. 17(3):106-112.
46. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martin C, Silva A. **2004**. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*. 31(12):1061-1069.
47. Loesche WJ. **1992**. DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. *J Periodontol*. 63(12 Suppl):1102-1109.
48. Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, van Poperin N, Hujoel PP. **1992**. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: Can culture be considered the primary reference standard? *J Clin Microbiol*. 30(2):418-426.
49. Lofmark S, Edlund C, Nord CE. **2010**. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin Infect Dis*. 50 Suppl 1:S16-23.
50. Loomer PM. **2004**. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 34:49-56.
51. March Rossello GA, Gutierrez Rodriguez MP, Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Orduna Domingo A, Bratos Perez MA. **2015**. New procedure for rapid identification of microorganisms causing urinary tract infection from urine samples by mass spectrometry (MALDI-TOF). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 33(2):89-94.
52. Marsh PD, Bradshaw DJ. **1995**. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol*. 15(3):169-175.
53. Mayanagi G, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N. **2004**. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol Immunol*. 19(6):379-385.
54. Micheelis W. **2011**. Oral health in germany: An oral epidemiological outline. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 54(9):1022-1026.
55. Micheelis W, Schiffner U. **2006**. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV GmbH, Köln.
56. Mombelli A. **2005**. Clinical parameters: biological validity and clinical utility. *Periodontol 2000*. 39:30-39.

57. Mombelli A, Almaghlouth A, Cionca N, Cancela J, Courvoisier DS, Giannopoulou C. **2017**. Microbiological response to periodontal therapy and multivariable prediction of clinical outcome. *J Periodontol*.1-18.
58. Mombelli A, Almaghlouth A, Cionca N, Courvoisier DS, Giannopoulou C. **2015**. Differential benefits of amoxicillin-metronidazole in different phases of periodontal therapy in a randomized controlled crossover clinical trial. *J Periodontol*. 86(3):367-375.
59. Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. **2002**. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol*. 29 Suppl 3:10-21; discussion 37-18.
60. Moore WE. **1987**. Microbiology of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 22(5):335-341.
61. Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Ranney RR. **1983**. Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect Immun*. 42(2):510-515.
62. Nakamura M, Slots J. **1983**. Salivary enzymes. Origin and relationship to periodontal disease. *J Periodontal Res*. 18(6):559-569.
63. Nunn ME. **2003**. Understanding the etiology of periodontitis: An overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000*. 32:11-23.
64. Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. **2001**. PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *J Clin Periodontol*. 28(6):576-582.
65. Olsen I. **2015**. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 34(5):877-886.
66. Ostergaard C, Hansen SG, Moller JK. **2015**. Rapid first-line discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains using MALDI-TOF MS. *Int J Med Microbiol*. 305(8):838-847.
67. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F et al. **2018**. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 89 Suppl 1:S173-S182.
68. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. **2001**. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 183(12):3770-3783.
69. Plagmann H-C. **1998**. Lehrbuch der Parodontologie. Carl Hanser Verlag, München.

70. Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. **2014.** Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *J Periodontol.* 85(1):160-169.
71. Ranney RR, Best AM, Breen TJ, Moore WE, Moore LV. **1987.** Bacterial flora of progressing periodontitis lesions. *J Periodontal Res.* 22(3):205-206.
72. Rateitschak K, Wolf H. **2004.** Farbatlant der Zahnmedizin 1 Parodontologie. 3., vollst. überarb. u. erw. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
73. Ready D, D'Aiuto F, Spratt DA, Suvan J, Tonetti MS, Wilson M. **2008.** Disease severity associated with presence in subgingival plaque of *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Tannerella forsythia*, singly or in combination, as detected by nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 46(10):3380-3383.
74. Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D. **1996.** Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Periodontal Res.* 31(7):496-501.
75. Rodriguez-Sanchez B, Alcala L, Marin M, Ruiz A, Alonso E, Bouza E. **2016.** Evaluation of MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) for routine identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe.* 42:101-107.
76. Rupf S, Breitung K, Schellenberger W, Merte K, Kneist S, Eschrich K. **2005.** Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Oral Microbiol Immunol.* 20(5):267-273.
77. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. **2004.** Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol.* 31(12):1034-1047.
78. Schiffner U, Hoffmann T, Kerschbaum T, Micheelis W. **2009.** Oral health in german children, adolescents, adults and senior citizens in 2005. *Community Dent Health.* 26(1):18-22.
79. Schmitt BH, Cunningham SA, Dailey AL, Gustafson DR, Patel R. **2013.** Identification of anaerobic bacteria by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with on-plate formic acid preparation. *J Clin Microbiol.* 51(3):782-786.

80. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, Kostrzewa M. **2011**. Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J Mol Diagn*. 13(6):701-706.
81. Schubert S, Wieser A. **2010**. MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik. *BIOspektrum* 7/2010:760-762.
82. Schubert S, Wieser A. **2011**. Einsatz der Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in der mikrobiologischen Routinediagnostik. *Laboratoriumsmedizin - Journal of Laboratory Medicine*. 35:195-203.
83. Schutzhold S, Holtfreter B, Hoffmann T, Kocher T, Micheelis W. **2013**. Trends in dental health of 35- to 44-year-olds in West and East Germany after reunification. *J Public Health Dent*. 73(1):65-73.
84. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. **2009**. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*. 49(4):543-551.
85. Slots J. **1977**. The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand J Dent Res*. 85(2):114-121.
86. Slots J. **1986**. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol*. 1(1):48-57.
87. Slots J, Research S, Therapy C. **2004**. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol*. 75(11):1553-1565.
88. Slots J, Ting M. **1999**. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000*. 20:82-121.
89. Soares GM, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte PM, Feres M. **2012**. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci*. 20(3):295-309.
90. Socransky SS, Haffajee AD. **2002**. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 28:12-55.
91. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. **1998**. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 25(2):134-144.

92. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. **2004**. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol*. 19(6):352-362.
93. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. **2012**. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol*. 50(3):927-937.
94. Stingu CS, Borgmann T, Rodloff AC, Vielkind P, Jentsch H, Schellenberger W, Eschrich K. **2015**. Rapid identification of oral *Actinomyces* species cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. *J Oral Microbiol*. 7:26110.
95. Stingu CS, Rodloff AC, Jentsch H, Schaumann R, Eschrich K. **2008**. Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. *Oral Microbiol Immunol*. 23(5):372-376.
96. Syed SA, Loesche WJ. **1972**. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol*. 24(4):638-644.
97. Takeuchi Y, Umeda M, Ishizuka M, Huang Y, Ishikawa I. **2003**. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *J Periodontol*. 74(10):1460-1469.
98. Tal M. **1980**. Periodontal disease and oral hygiene. Described by Antoni van Leeuwenhoek. *J Periodontol*. 51(11):668-669.
99. Tanner AC, Izard J. **2006**. *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontol 2000*. 42:88-113.
100. Taylor GW. **2001**. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol*. 6(1):99-112.
101. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. **2018**. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 89 Suppl 1:S159-S172.
102. Uematsu H, Hoshino E. **1992**. Predominant obligate anaerobes in human periodontal pockets. *J Periodontal Res*. 27(1):15-19.
103. van Winkelhoff AJ, Herrera Gonzales D, Winkel EG, DelleMijn-Kippuw N, Vandenbroucke-Grauls CM, Sanz M. **2000**. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol*. 27(2):79-86.

104. van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. **2002**. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol*. 29(11):1023-1028.
105. Veloo AC, Knoester M, Degener JE, Kuijper EJ. **2011**. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 17(10):1501-1506.
106. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. **2012**. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*. 93(3):965-974.
107. Wyss C. **1989**. Dependence of proliferation of Bacteroides forsythus on exogenous N-acetylmuramic acid. *Infect Immun*. 57(6):1757-1759.
108. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. **2000**. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 27(10):722-732.
109. Zabbe JB, Zanardo L, Megraud F, Bessede E. **2015**. MALDI-TOF mass spectrometry for early identification of bacteria grown in blood culture bottles. *J Microbiol Methods*. 115:45-46.
110. Zambon JJ, Nakamura M, Slots J. **1985a**. Effect of periodontal therapy on salivary enzymatic activity. *J Periodontal Res*. 20(6):652-659.
111. Zambon JJ, Reynolds HS, Chen P, Genco RJ. **1985b**. Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival dental plaque. Comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of Bacteroides gingivalis. *J Periodontol*. 56(11 Suppl):32-40.
112. Zhou M, Yang Q, Kudinha T, Sun L, Zhang R, Liu C, Yu S, Xiao M, Kong F, Zhao Y et al. **2017**. An Improved In-house MALDI-TOF MS Protocol for Direct Cost-Effective Identification of Pathogens from Blood Cultures. *Front Microbiol*. 8:1824.

7 Abbildungsverzeichnis und Tabellen

- Abbildung 1: Assoziation zwischen subgingivalen Bakterienspezies (Socransky und Haffajee, 2002)
- Abbildung 2: Graphische Darstellung des Studienablaufs
- Abbildung 3: Entnahme der subgingivalen Plaqueprobe
- Abbildung 4: Plaqueproben für PariDent-Test
- Abbildung 5: Plaqueproben für MALDI-TOF MS
- Abbildung 6: Anaerobe Kammer
- Abbildung 7: Anaerobe Indikator-Teststreifen
- Abbildung 8: Bakterienkulturen auf Brucella Agar und Schädler Agar
- Abbildung 9: Isolierte Reinkulturen
- Abbildung 10: Isolierte Reinkulturen
- Abbildung 11: MALDI-TOF MS-Gerät
- Abbildung 12: Graphische Darstellung des Arbeitsablaufs der MALDI-TOF MS-basierten Speziesbestimmung
- Abbildung 13: α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure; $C_{10}H_7NO_3$
- Abbildung 14: MALDI-Targetplatte mit aufgetragenen Proben
- Abbildung 15: Prinzip der MALDI-TOF MS-basierten Entstehung speziesspezifischer Massenspektren (Schubert und Wieser, 2010)
- Abbildung 16: PariDent-Testkit
- Abbildung 17: MagNA Pure LC DNA Testkit
- Abbildung 18: Beladenes MagNA Pure LC System
- Abbildung 19: PariDent Hybridisierungsmodule
- Abbildung 20: Farbumschlag in den Mikrotiterplattenkavitäten
- Abbildung 21: Farbumschlag in den Mikrotiterplattenkavitäten
- Abbildung 22: Parodontalerkrankungen bei Familienmitgliedern
- Abbildung 23: Einnahme von Medikamenten
- Abbildung 24: Verteilung der verordneten Medikamente
- Abbildung 25: Manifestation von systemischen Erkrankungen
- Abbildung 26: Einteilung der Patienten nach Rauchverhalten
- Abbildung 27: Frühere Parodontalbehandlung
- Abbildung 28: Manifestation von Symptomen einer Parodontitis
- Abbildung 29: Zahnverlust durch Parodontitis

Abbildung 30: Anzahl verlorener Zähne durch Parodontitis

Abbildung 31: Verteilung der Anzahl behandlungsbedürftiger Stellen

Abbildung 32: Verteilung der Anzahl behandlungsbedürftiger Zähne

Abbildung 33: Auftreten der identifizierten Spezies der Gattung *Streptococcus spp.*

Abbildung 34: Auftreten der identifizierten Spezies der Gattung *Prevotella spp.*

Abbildung 35: Auftreten von *Actinomyces spp.* in den Patientenproben

Abbildung 36: Auftreten von *Campylobacter spp.* in den Patientenproben

Abbildung 37: Auftreten von *Capnocytophaga spp.* in den Patientenproben

Abbildung 38: Auftreten von *Fusobacterium spp.* in den Patientenproben

Abbildung 39: Verteilung kleinerer Bakteriengattungen bzw. einzelner Spezies in den Patientenproben

Abbildung 40: Identifikation parodontitisassoziierter Mikroorganismen

Abbildung 41: Erregeridentifikation durch PariDent

Abbildung 42: Nachweis von *Fusobacterium spp.* mit beiden Methoden

Abbildung 43: Übereinstimmung bezüglich *Prevotella spp.*

Abbildung 44: Übereinstimmung bezüglich *P. micra*

Tabelle 1: PariDent PAF/PMT-PCR

Tabelle 2: Herstellung des PAF/PMT-Master Mix

Tabelle 3: Auswertekriterien der Extinktionen

Tabelle 4: Zusammenfassung der deskriptiven klinischen Parameter

8

Abkürzungsverzeichnis

ASS	Acetylsalicylsäure
BANA	N- α -benzoyl-DL-arginin-2-naphthylamid
BHI	Brain Heart Infusion
BOP	Blutung auf Sondierung
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
ELISA	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay
E-Test	Epsilometer-Test
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IfSG	Infektionsschutzgesetz
KBE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
nm	Nanometer
PCR	Polymerasekettenreaktion
POD	Peroxidase
py	pack year, Packungsjahr
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
TBC	Tuberkulose
TMB	Tetramethylbenzidin
TST	Taschensondierungstiefe

9 Danksagung

Für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas und die gute Betreuung möchte ich mich an allererster Stelle bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Karin Christine Huth bedanken.

Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Hickel, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und Dekan der Medizinischen Fakultät der Universität München, meinen Dank für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Doktorarbeit in seiner Abteilung aussprechen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Sören Schubert für die freundliche Erlaubnis zur Benutzung des MALDI-TOF MS-Gerätes in der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene im Max-von-Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem stellvertretenden Studienleiter Herrn Dr. Maximilian Kollmuß für die überdurchschnittlich gute Betreuung bedanken. Danke für den unermüdlichen Einsatz, für die Geduld und vor allem für die besondere Hilfsbereitschaft bei der Durchführung meiner Versuchsreihe.

Schließlich bin ich meiner Familie und meinem Freund Frederic dafür dankbar, dass sie mich in den letzten Jahren immer unterstützt haben. Vielen lieben Dank an meine Oma Anna, die mir auch in schwierigen Zeiten immer zur Seite stand und zahlreiche Kerzen für mich zuhause und in der Kirche angezündet hat. Ebenso möchte ich mich bei meiner Tante Ulrike und bei meinem Onkel Martin für ihre stetige Hilfsbereitschaft bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich vor allem meiner Mama Rita von ganzem Herzen danken. Ich bin ihr unendlich dankbar für die großzügige finanzielle und insbesondere seelische Unterstützung während meines Studiums und bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Ich danke ihr, dass sie immer an mich glaubt.

Anhang 1 (Patienteninformation und Einwilligungs- erklärung)



POLIKLINIK FÜR ZAHNERHALTUNG
UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. REINHARD HICKEL



OÄ Prof. Dr. Karin C. Huth MME
ZA Maximilian Kollmuß

Telefon +49 (0)89 4400-59378
+49 (0)89 4400-59411
Telefax +49 (0)89 4400-59302

khuth@dent.med.uni-muenchen.de
kollmuss@dent.med.uni-muenchen.de

www.dent.med.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Goethestr. 70
D-80336 München

I. Patienteninformation

Studientitel:

Evaluation der Eignung von MALDI-TOF/MS zur mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontologie

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

Sie werden gefragt, ob Sie damit einverstanden sind an einer Studie im Bereich der Parodontologie teilzunehmen.

Bei Ihnen wurde in einer Untersuchung eine behandlungsbedürftige Entzündung des Zahnhalteapparats (Bindegewebe und den Zahn umgebenden Knochen) diagnostiziert. Diese als „Parodontitis“ bezeichnete Erkrankung ist eine durch Bakterien ausgelöste Entzündung, die unbehandelt mit einer irreversiblen Zerstörung der oben genannten Gewebe einhergeht und damit in der Folge zur Lockerung oder gar zum Verlust von Zähnen führen kann.

Der für die Therapie entscheidende Schritt ist die Beseitigung der spezifischen Bakterien aus der Zahnfleischtasche. Dazu kommen, neben der mechanischen Reinigung der Zahnwurzeloberfläche („subgingivale Kürettage“), bei schweren Verlaufsformen auch Antibiotika in Tablettenform zum Einsatz („systemische Antibiotikatherapie“). Die Auswahl des Antibiotikums richtet sich dabei nach dem Vorhandensein bestimmter Bakterien, welche vor der Therapie mit einem Keimtest nachgewiesen werden.

Dieser Keimtest wird derzeit nicht von der gesetzlichen Krankenversicherung übernommen, stellt aber einen wichtigen Pfeiler für die Wahl des passenden

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Anschrift: Goethestr. 70, D-80336 München, Telefon (089) 5160-9301
Verkehrsverbindung: U3, U6 oder Bus 58 bis Haltestelle Goetheplatz

Antibiotikums dar. Ein Nachteil des derzeit eingesetzten Verfahrens ist, dass nur Bakterien nachgewiesen werden können, die auch in der Probe vermutet werden und somit auch gesucht werden („geschlossenes System“). Ein neues mikrobiologisches Untersuchungsverfahren ermöglicht die Bestimmung eines größeren Bakterienspektrums (MALDI-TOF-MS). In dieser Studie soll nun untersucht werden, ob und wie gut sich MALDI-TOF-MS zur Diagnostik von Parodontitis-auslösenden Bakterien eignet.

Nach einer parodontologischen Untersuchung mit Messung der Tiefe der Zahnfleischtaschen soll für diese Studie bei Ihnen eine mikrobiologische Probe an vier verschiedenen Stellen aus vier verschiedenen Zahnfleischtaschen entnommen werden. Dazu wird der behandelnde Zahnarzt eine ca. 1 mm dicke sterile Papierspitze in die Zahnfleischtasche einführen und diese dort 10 Sekunden belassen. In dieser Zeit wird die Flüssigkeit in der Zahnfleischtasche mit den darin enthaltenen Bakterien aufgesaugt und steht in der Folge für Untersuchungen der Bakterien zur Verfügung. Im Anschluss daran erfolgt die Anzucht der Bakterien und die Bestimmung der genauen Bakterienspezies mittels MALDI-TOF-MS sowie dem derzeit gängigen klinischen Keimtest zur Kontrolle.

Die Probeentnahme mit der Papierspitze ist für Sie schmerzfrei und es kommt dadurch für Sie zu keiner Verzögerung oder Einschränkung der weiteren Behandlung. Wenn Sie dies wünschen können wir Ihnen das Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung mitteilen und ggf. die Therapie mit einem Antibiotikum einleiten, wenn entsprechende Bakterien nachgewiesen wurden. Es werden im Rahmen dieser Studie keine zahnärztlich-invasiven Maßnahmen durchgeführt. Somit entstehen keine studienspezifischen zusätzlichen Belastungen für Sie.

Eine Probandenversicherung oder Wegeversicherung wurde nicht abgeschlossen, da keine studienspezifische Belastungen bzw. Klinikbesuche anfallen.

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, gespeichert und verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode.

Im Falle des Widerrufs Ihrer Einwilligung werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten in irreversibel anonymisierter Form nicht weiter verwendet. Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiterin (OÄ Prof. Dr. K. Huth) und ihrem Stellvertreter (ZA M. Kollmuß). Die Unterlagen werden 10 Jahre verschlossen in

den Räumen der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Universität München aufbewahrt.

Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es Ihre eigene Sicherheit erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“).

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

Die Teilnahme an dieser Studie erfolgt freiwillig. Sie können jederzeit und ohne Angabe von Gründen ihr Einverständnis zur Teilnahme an dem Forschungsvorhaben zurücknehmen, ohne dass Ihnen hieraus Nachteile entstehen.

Aufklärender Zahnarzt: _____

II. Einwilligungserklärung

Studentitel:

Evaluation der Eignung von MALDI-TOF/MS zur mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontologie

Hiermit willige ich in die Teilnahme an der oben genannten klinischen Studie mit den dazugehörigen Probenentnahmen nach Maßgabe der Patienteninformation ein.

Die Teilnahme erfolgt freiwillig.

Es wurde keine besondere Probanden-/Wegeunfallversicherung abgeschlossen.

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, gespeichert und verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode. Im Falle des Widerrufs Ihrer Einwilligung werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten in irreversibel anonymisierter Form nicht weiter verwendet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiterin (OÄ Prof. Dr. K. Huth) und ihrem Stellvertreter (ZA M. Kollmuß) Die Unterlagen werden 10 Jahre verschlossen in den Räumen der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Universität München aufbewahrt. Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es Ihre eigene Sicherheit erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“). Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen das Einverständnis zur Teilnahme an dem Forschungsvorhaben zurücknehmen kann, ohne dass mir hieraus Nachteile entstehen.

Ich bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden.

München, _____

Unterschrift Patient: _____

Unterschrift Zahnarzt: _____

Anhang 2 (Anamnesebogen)



POLIKLINIK FÜR ZAHNERHALTUNG
UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. REINHARD HICKEL



Evaluation der Eignung von MALDI-TOF/MS zur mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontologie

Patienten-Verschlüsselung:

(CODEAUFKLEBER)

Datum: _____

Familienanamnese

- 1.) Konnten bei Familienmitgliedern Erkrankungen des Zahnfleisches und des Zahnhalteapparates beobachtet werden?

☐ nein ☐ ja

falls ja,
bei welchen Familienmitgliedern? _____

Eigenanamnese

- 2.) Nehmen Sie derzeit Medikamente ein?

☐ nein ☐ ja

falls ja,
welche Medikamente und seit wann? _____

- 3.) Leiden Sie an Diabetes mellitus, Osteoporose, Atherosklerose, oder einer Bluterkrankung?

☐ nein ☐ ja

falls ja,
unter welcher Erkrankung bzw. Erkrankungen? _____

- 4.) Konsumieren Sie derzeit Zigaretten bzw. haben Sie in der Vergangenheit geraucht?

☐ nein ☐ ja

falls ja,
wie viele Zigaretten rauchen Sie aktuell pro Tag? _____

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Anschrift: Goethestr. 70, D-80336 München, Telefon (089) 5160-9301
Verkehrsverbindung: U5, U6 oder Bus 59 bis Haltestelle Goetheplatz

wann haben Sie angefangen zu rauchen? _____

wie viele Zigaretten haben Sie früher pro Tag geraucht? _____

falls Sie nicht mehr rauchen, wann haben Sie aufgehört? _____

5.) Wurde bei Ihnen bereits eine parodontologische Behandlung durchgeführt?

☐ nein

☐ ja

falls ja,
welche Behandlungsmaßnahmen wurden ergriffen? _____

wann wurden diese durchgeführt? _____

6.) Haben Sie im Moment oder in den letzten 2 Wochen Symptome wie Zahnfleischbluten oder Zahnlockerung wahrgenommen?

☐ nein

☐ ja

falls ja,
welche Symptome? _____

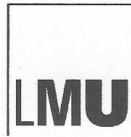
7.) Wurden Ihnen in der Vergangenheit Zähne gezogen aufgrund zu starker Lockerung?

☐ nein

☐ ja

falls ja,
welche Zähne? _____

Anhang 3 (Befundbogen)



KLINIKUM
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

POLIKLINIK FÜR ZAHNERHALTUNG
UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. REINHARD HICKEL



Evaluation der Eignung von MALDI-TOF/MS zur mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontologie

Patienten-Verschlüsselung:

(CODEAUFKLEBER)

Datum: _____

Zahnärztlicher Befund

Perkussion																
Sensibilität																
Befund																
Zahnersatz																
	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
Zahnersatz																
Befund																
Sensibilität																
Perkussion																

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Anschrift: Goethestr. 70, D-80336 München, Telefon (089) 5160-9301
Verkehrsverbindung: U3, U6 oder Bus 58 bis Haltestelle Goetheplatz

[illegible][illegible]

Beh.-bed.																	
Lockerung																	
TST/BOP																	
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	
lingual																	
Unterkiefer																	
vestibulär																	
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	
TST/BOP																	
Lockerung																	
Beh.-bed.																	

Anhang 4 (Votum der Ethikkommission)



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

ETHIKKOMMISSION BEI DER LMU MÜNCHEN



Ethikkommission · Pettenkoferstr. 8 · 80336 München

Herrn
Prof. Dr. med. dent. Karin Huth
Klinikum der Universität München
Zahnklinik
Goethestr. 70
80336 München

Vorsitzender:
Prof. Dr. W. Eisenmenger
Telefon+49 (0)89 440055191
Telefax+49 (0)89 440055192
Ethikkommission@
med.uni-muenchen.de
www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Anschrift:
Pettenkoferstr. 8a
D-80336 München

18.05.2016/sc

Unser Zeichen: **178-16** (bitte bei Schriftwechsel angeben)

Beratung nach geltendem Fakultätsrecht Ergänzung zum Votum vom 18.04.2016

Studientitel: Evaluation der Eignung von MALDI-TOF/MS zur mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontologie
Antragsteller: Prof. Dr. med. dent. Karin Huth, Klinikum der Universität München, Zahnklinik, Goethestr. 70, 80336 München

Sehr geehrte Frau Prof. Dr. Huth,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 25.04.2016 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen

- Antragsformular
- Studienprotokoll
- Patienteninformation u. Einverständniserklärung
- CD mit allen genannten Dokumenten.

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Allgemeine Hinweise:

- Änderungen im Verlauf der Studie sind der EK zur erneuten Prüfung vorzulegen.
- Schwerwiegende unerwartete Ereignisse im Rahmen der Studie sind der EK mitzuteilen.
- Das Ende der Studie ist anzuzeigen und das Ergebnis vorzulegen.
- Die ärztliche und juristische Verantwortung bei der Durchführung der Studie verbleibt uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern.

Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mitglieder der Kommission:
Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. C. Bausewein, PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. B. Emmerich, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. K. Hahn, Dr. B. Henrikus, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. D. Nowak, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. A. Yassouridis, Dr. Ch. Zach

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. W. Eisenmenger
Vorsitzender der Ethikkommission

Anhang 5 (Rezepte und Versuchsansätze)

Transportmedium der subgingivalen Plaqueprobe:

Papierspitze in 500 µl eines Transportmediums (VMG-II, Möller, 1966) geben
0,03g Phenylquecksilberacetat in 800ml H₂O-bidest lösen (leicht erwärmen)
2,4g CaCl₂ x 6H₂O
4,2g KCl
10g NaCl
1g MgSO₄ x 7H₂O
100g Natriumglycerophosphat
Auffüllen auf 1000ml mit H₂O-bidest → Salt Stock Solution II

0,1g mikrobiologischen Agar in 900ml H₂O-bidest lösen durch erhitzen
10g Bacto-Gelatin
0,5g Tryptose
0,5g Thiotone
0,5g Cystein-HCl
0,5ml Thioglykolsäure
10g Aktivkohle (für die Mikrobiologie)
100ml Salt Stock Solution II zugeben
pH-Wert mit NaOH auf 7,5 einstellen

Anzucht der Plaquebakterien:

Schädler Agar (Schaedler Agar with Vitamin K1 und 5% Sheep Blood; BD, New Jersey, USA)

8,2g Pankreatisch abgebautes Casein
2,5g Peptisch abgebautes Tiergewebe
1,0g Papainisch abgebautes Sojamehl
5,8g Glucose
5,0g Hefeextrakt
1,7g Natriumchlorid
0,8g Dikaliumphosphat
0,4g L-Cystin
0,01g Hämin
0,01g Vitamin K1
3,0g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
13,5g Agar
5% Schafblut, defibriniert
gelöst in 1000 ml Aqua bidest

Brucella Agar (Brucella 5% Sheep Blood Agar with Hemin, Vitamin K1; BD, New Jersey, USA)

10,0g Pankreatisch abgebautes Casein
10,0g Peptisch abgebautes Tiergewebe
2,0g Hefeextrakt
1,0g Glucose
5,0g Natriumchlorid
0,1g Natriumdisulfid

0,005g Hemin
0,01g Vitamin K1
15,0g Agar
5% Schafblut, defibriniert
gelöst in 1000 ml Aqua bidest

Herstellung von 70%-iger Ameisensäure:

30 Teile H₂O-bidest mit 70 Teilen Säure mischen

Stammerhaltung der Keime:

Brain Heart Infusion (BHI)

37g Brain Heart Infusion in 1000ml H₂O-bidest lösen
15 min bei 121°C autoklavieren

Programmierung des Thermocyclers:

94 °C	5 min	} 40 x
94 °C	25 Sekunden	
58 °C	25 Sekunden	
72 °C	45 Sekunden	
72 °C	3 min	

Reagenzien des PariDent-Testkits:

PCR-Modul

PAF Primer: markierte Oligonukleotidprimer
PMT Primer: markierte Oligonukleotidprimer
dNTP Nukleotidmix: dATP, cCTP, dGTP, dTTP
Negativkontrolle
Reagenzienkontrolle

Hybridisierungs-Modul

Farbkodierte Mikrotiterstreifen mit spezifischer Oligonukleotidsonde
Hybridisierungspuffer: Standard-Saline-Citrat-Puffer, Natriumdodecylsulfat, N-Lauryl-Sarkosin
Stringente Waschlösung: Standard-Saline-Citrat-Puffer, Natriumdodecylsulfat
Waschpuffer (konzentriert): Phosphatpuffer, NaCl, Detergens, Konservierungsstoffe Methylisothiazolon und Oxypyron
POD-Konjugat (konzentriert): Methylisothiazolon, Chloracetamid, Dimethylaminoantipyrine
TMB-Substratlösung
Stopplösung: 25%-ige Phosphorsäure
Lysepuffer

Herstellung des Waschpuffers:

Waschpufferkonzentrat in einem Verhältnis von 1:20 mit H₂O-bidest verdünnen

Herstellung des POD-Konjugats:

Konzentriertes Konjugat mit verdünntem Waschpuffer in einem Verhältnis von 1:100 verdünnen

Anhang 6 (Tabellen und Übersichten)

Identifizierte bakterielle Spezies	N (Patientenproben)
<i>Abiotrophia defectiva</i>	1
<i>Actinomyces georgiae</i>	2
<i>Actinomyces naeslundii</i>	7
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	19
<i>Actinomyces oris</i>	13
<i>Aggregatibacter segnis</i>	1
<i>Atopobium parvulum</i>	1
<i>Atopobium rimae</i>	3
<i>Bacteroides ovatus</i>	1
<i>Bifidobacterium dentium</i>	2
<i>Campylobacter gracilis</i>	2
<i>Campylobacter rectus</i>	8
<i>Campylobacter showae</i>	1
<i>Capnocytophaga granulosa</i>	1
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	3
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	3
<i>Dialister pneumosintes</i>	3
<i>Eggerthia cateniformis</i>	2
<i>Eikenella corrodens</i>	6
<i>Eubacterium brachy</i>	1
<i>Eubacterium yurii</i>	1
<i>Fusobacterium naviforme</i>	2
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	19
<i>Fusobacterium spp.</i>	6
<i>Gemella morbillorum</i>	7
<i>Granulicatella adiacens</i>	3
<i>Leptotrichia goodfellowii</i>	1
<i>Leptotrichia trevisanii</i>	1
<i>Neisseria elongata</i>	1
<i>Neisseria oralis</i>	1
<i>Parvimonas micra</i>	20
<i>Prevotella baroniae</i>	3
<i>Prevotella buccae</i>	3
<i>Prevotella denticola</i>	4
<i>Prevotella intermedia</i>	4
<i>Prevotella loeschii</i>	1
<i>Prevotella maculosa</i>	1
<i>Prevotella nigrescens</i>	8
<i>Prevotella oris</i>	2
<i>Prevotella salivae</i>	1
<i>Prevotella sp.</i>	2
<i>Rothia aeria</i>	1
<i>Rummeliibacillus suwonensis</i>	1

<i>Selenomonas infelix</i>	1
<i>Slackia exigua</i>	1
<i>Solobacterium moorei</i>	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
<i>Streptococcus anginosus</i>	10
<i>Streptococcus constellatus</i>	15
<i>Streptococcus cristatus</i>	3
<i>Streptococcus gordonii</i>	6
<i>Streptococcus intermedius</i>	7
<i>Streptococcus massiliensis</i>	1
<i>Streptococcus mitis</i>	5
<i>Streptococcus mutans</i>	2
<i>Streptococcus oralis</i>	24
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1
<i>Streptococcus sinensis</i>	2
<i>Veillonella dispar</i>	1
<i>Veillonella parvula</i>	13

Verteilung der durch MALDI-TOF MS identifizierten Bakterienspezies in den 39 Patientenproben

[illegible]

Auswertung - DentoELISA - PariDent

Pat. Nr.	1	2	3	4	5	6
AA	-	-	-	-	-	-
PG	-	-	-	-	-	-
FN	+++	+++	+++	++	+++	+++
PI	-	+++	+++	-	-	-
TF	+++	+++	+++	-	+++	+++
PM	+++	+++	+++	+++	+++	+++
TD	+++	+++	+++	+++	-	++

Pat. Nr.	7	8	9	10	11	12
AA	++	-	-	+	-	++
PG	-	-	-	-	-	-
FN	++	+++	++	++	++	++
PI	-	-	+++	+	+++	-
TF	-	+++	+++	+++	++	+++
PM	+++	+++	-	++	-	+++
TD	-	+++	+++	++	+++	+++

Pat. Nr.	13	14	15	16	17	18
AA	+++	-	-	-	-	-
PG	-	-	-	-	-	-
FN	+++	+++	-	+++	+++	+++
PI	+++	+++	++	+	-	-
TF	+++	+++	+++	+++	+++	++
PM	+++	+++	+++	-	+++	+++
TD	+++	+++	+++	+++	+++	-

Pat. Nr.	19	20	21	22	23	24
AA	-	-	-	+	-	-
PG	-	-	-	-	-	+++
FN	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PI	-	+++	+++	+++	-	+
TF	+++	+++	++	+++	+++	+++
PM	+++	+++	+++	++	+++	+++
TD	+++	++	++	+++	+++	-

Pat. Nr.	25	26	27	28	29	30
AA	-	-	-	-	-	-
PG	-	+++	-	+++	-	-
FN	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PI	++	+++	+	-	-	-
TF	++	+++	+++	+++	-	+++
PM	-	+	+++	+++	+++	++
TD	-	+++	+++	++	-	-

Pat. Nr.	31	32	33	34	35	36
AA	-	-	-	-	-	-
PG	+++	+++	+++	+++	+++	-
FN	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PI	+++	+	+++	+++	+++	+++
TF	+++	+++	+	+	++	++
PM	+++	-	+++	+++	+++	+++
TD	+++	+++	-	++	+++	+++

Pat. Nr.	37		39	40
AA	-		-	+++
PG	+++		-	-
FN	+++		+	+++
PI	+++		+++	++
TF	+		++	+++
PM	+++		-	+
TD	+		-	+++

Eidesstattliche Versicherung

Lindner, Stefanie

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Evaluation der Eignung von MALDI-TOF MS zur mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontologie“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 2.8.2019

Stefanie Lindner